



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização bioquímica e propriedades biológicas de
diferentes metaloproteinases de tripanossomatídeos
(*Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e
Trypanosoma brucei brucei)**

Joana Patrícia Molato Figueiredo Lopes Monteiro

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**
(na especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional)

(MARÇO DE 2015)



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização bioquímica e propriedades biológicas de
diferentes metaloproteínas de tripanossomatídeos**

(*Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e

***Trypanosoma brucei brucei*)**

Joana Patrícia Molato Figueiredo Lopes Monteiro

Orientador: Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

Co-orientadora: Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de grau de mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional

(MARÇO DE 2015)

Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos;

Ao Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

À Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

Aos meus PAIS e família mais próxima

Aos meus gatinhos

Aos meus amigos e colegas que de algum modo contribuíram para a minha felicidade

E a DEUS.

Embora parcas, as minhas palavras são sentidas;

O meu MUITO OBRIGADA!

Resumo

Leishmania spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* são os agentes etiológicos da leishmaniose, doença de Chagas e doença do sono, respectivamente. Estas doenças caracterizam-se por serem majoritariamente prevalentes em regiões tropicais e subtropicais onde impera a pobreza. Não obstante os esforços no sentido de as controlar/erradicar, atualmente as Doenças Tropicais Negligenciadas são endêmicas em 149 países. Desta realidade surge a necessidade de melhor compreensão das suas interações com o hospedeiro vertebrado. Neste sentido, pretendeu-se caracterizar bioquimicamente e biologicamente as metaloproteases, enzimas comuns a tripanossomatídeos envolvidas nos processos de virulência deste trio de protozoários de importância clínica. Traçou-se o perfil enzimático, em géis de colagénio, gelatina e caseína, de extratos de formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. shawi*; de formas epimastigotas e tripomastigotas das estirpes Y, Bolívia, e QMM5 de *T. cruzi* e de tripomastigotas sanguíneos de *T. b. brucei*. As concentrações mínimas inibitórias de metaloproteases foram estimadas na presença da 1,10-fenantrolina, um inibidor de metaloproteases. Para avaliar a atividade metaloproteolítica de cada extrato foi otimizada uma metodologia que permitiu quantificar o nível de atividade enzimática na presença e na ausência da 1,10-fenantrolina. O estudo das propriedades biológicas de cada extrato consistiu na avaliação da interação das metaloproteinases dos diferentes tripanossomatídeos com eritrócitos humanos (Eh) e com possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento. Todos os extratos foram enzimaticamente ativos nos diferentes substratos e cada parasita evidenciou um perfil zimográfico distinto. Nos extratos de *Leishmania* spp. foi observada a expressão de enzimas com massa molecular entre os 50 e 80 kDa, possivelmente a glicoproteína de 63 kDa (gp63). Em extratos de *T. cruzi* e *T. b. brucei* foi detetado, respectivamente, a expressão de enzimas de aproximadamente 40 e 20 kDa. O decréscimo da atividade enzimática total dos extratos na presença de concentrações crescentes de 1,10-fenentrolina confirmou a natureza metaloproteica das enzimas. O perfil de atividade das metaloproteases de *L. shawi* mostrou-se distinto do evidenciado pelas restantes espécies e cada estirpe de *T. cruzi* exibiu um padrão metaloproteolítico diferente. Das metaloproteases estudadas, a de *T. b. brucei* apresentou a menor velocidade de reação enzimática.

Os resultados obtidos nos ensaios de sensibilização de Eh por extratos de *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. b. brucei* permitiram dar início à criação de um modelo biológico de infecção tendo ficado estabelecido que em *Leishmania* spp. ocorre a sensibilização de Eh pelas metaloproteases que, por sua vez, são lisados pelo sistema complemento. Dada a importância das funções biológicas destas enzimas, o conhecimento do perfil de expressão nos diferentes tripanossomatídeos e dos mecanismos biológicos de infecção pode constituir uma oportunidade para a identificação de novos alvos terapêuticos e, consequentemente, para o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas e terapêuticas.

Palavras-chave: Tripanossomatídeos; metaloproteases; sistema complemento.

Abstract

Leishmania spp., *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* are the etiologic agents of leishmaniasis, Chagas sickness and sleeping disease, respectively. These diseases are prevalent in tropical and subtropical regions between poor populations. Despite the efforts to control/eradicate, currently neglected tropical diseases are endemic in 149 countries. From this reality arises the need for better understanding the interactions established by the parasites with the respective vertebrate host. Taken into account the above considerations, we aimed to characterize biochemically and biologically metalloproteases, a set of enzymes common to *Leishmania* and *Trypanosome* that are involved in several aspects of infectious process. The enzymatic profile of *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. shawi* promastigotes, of *T. cruzi* (strains Y, Bolívia, QMM5) epimastigotes and trypomastigotes and, of *T. b. brucei* trypomastigotes were evaluated in collagen, gelatin and casein gels. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were estimated in four species of *Leishmania* and in three *T. cruzi* strains in the presence of 1,10-phenanthroline, a specific inhibitor of metalloproteinase. To evaluate the proteolytic activity of each extract, an enzymatic fluorescent assay was optimized. This methodology allows to estimate the enzyme expression by measuring its activity in the presence and absence of 1,10-phenanthroline. Furthermore, the interaction of metalloproteinases of each trypanosomatid with human erythrocytes (Eh) and their presumable lysis mediated by complement system was also assessed. All extracts were enzymatically active in different substrates and each parasite evidenced a specific zymographic profile. An enzyme with a molecular mass of 50-80 kDa, possibly the 63 kDa glycoprotein, was detected in *Leishmania* species. Bands of approximately 40 and 20 kDa with enzymatic activity were observed in extracts of *T. cruzi* and *T. b. brucei*, respectively. The declining of extracts total enzymatic activity in the presence of increasing concentrations of 1,10-phenatroline confirmed the metalloproteolytic nature of enzymes. Furthermore, metalloproteolytic profile of *L. shawi* was different from other *Leishmania* species and each strain of *T. cruzi* exhibited a characteristic metalloproteolytic pattern. From all the studied parasites, *T. b. brucei* presented the lowest enzymatic reaction rate. Concerning the assays with Eh pre-treated with parasite extracts it was possible to establish a biological model of infection revealing that *Leishmania* spp. metalloproteases effectively sensitize Eh which are then lysed by complement system. Given the biological importance of metalloproteases, clarifying their role in the

establishment of infection and in the survival of tripanosomatids may constitute an opportunity to identify new targets and, consequently, for the design and development of new therapeutic and prophylactic strategies.

Keywords: *Trypanosomatidae*; metalloproteases; complement system.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Índice	vi
Índice de figuras	viii
Lista de abreviaturas.....	x
1. Introdução	1
1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas	1
1.2. Géneros de importância médica na família Trypanosomatidae.....	2
1.3. Principais formas morfológicas de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	4
1.4. <i>Leishmania</i> spp. - Ciclo de vida, biologia do parasita e aspetos clínicos da infeção	5
1.5. <i>Trypanosoma cruzi</i> - Ciclo de vida, biologia do parasita e aspetos clínicos da infeção	8
1.6. <i>Trypanosoma brucei</i> - Ciclo de vida, biologia do parasita e aspetos clínicos da infeção	10
1.6. Metaloproteases de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	12
1.6.1. Classificação das metaloproteases	13
1.6.2. Estrutura da gp63 de <i>Leishmania</i> spp.	13
1.6.3. Regulação da expressão génica de gp63	15
1.7. gp63 de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> : organização génica e expressão proteica	19
1.7.1. gp63 de <i>Leishmania</i> spp.	19
1.7.1. gp63 de <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.7.2. gp63 de <i>Trypanosoma brucei</i>	27
2. Objetivos.....	30
3. Materiais e Métodos	31
3.1. <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	31
3.2. Cultura axénica dos parasitas	33
3.2.1. Meios de cultura e sua composição	33
3.2.2. Cultura de <i>Leishmania</i> spp.	33
3.2.3. Cultura de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
3.2.4. Cultura de <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	34
3.3. Preparação dos extratos.....	35
3.4. Determinação da concentração proteica dos extratos	36
3.5. Caracterização bioquímica das metaloproteinases de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	37
3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida	37

3.5.2.	Zimografia	38
3.6.	Determinação da atividade de gelatinase e collagenase por fluorimetria	40
3.6.1.	Tratamento estatístico dos dados	40
3.7.	Ensaio biológico em eritrócitos humanos	41
3.7.1.	Preparação de soluções	41
3.7.2.	Obtenção de eritrócitos e soro humanos	42
3.7.3.	Sensibilização dos eritrócitos humanos com extratos de <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i>	42
3.7.4.	Estudo do efeito do complemento nos eritrócitos sensibilizados	43
4.	Resultados e Discussão	45
4.1.	Perfil proteico total de <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	45
4.2.	Atividade enzimática em géis de colagénio, gelatina e caseína	47
4.3.	Concentração mínima inibitória de metaloproteases em géis de colagénio	50
4.4.	Determinação da atividade de gelatinase e collagenase por ensaios de fluorimetria	52
4.4.1.	Atividade enzimática de gelatinase	52
4.4.1.	Atividade enzimática de collagenase	57
4.5.	Avaliação da interação das metaloproteases dos diferentes tripanosomatídeos com eritrócitos humanos e com possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento	62
4.5.1.	Sensibilização de Eh por contato direto com extratos de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	62
4.5.2.	Ensaio de estudo do complemento	63
4.5.3.	Ensaio de estudo do complemento na presença de EDTA	65
5.	Conclusão	68
6.	Referências bibliográficas	69

Índice de figuras

Figura 1: Classificação taxonómica de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> .	3
Figura 2: Diferentes formas morfológicas de <i>Leishmania</i> spp, <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> apresentadas durante o ciclo de vida dos parasitas	4
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	6
Figura 4: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral e respetivas espécies de <i>Leishmania</i> que as originam.	7
Figura 5: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 6: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	11
Figura 7: Estrutura tridimensional da gp63.	14
Figura 8: Composição do centro catalítico da gp63.	15
Figura 9: Tamanho estimado, em megabases (Mb), do genoma de <i>Leishmania major</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> e respetivo número estimado de genes e distribuição de clusters de genes ortólogos entre os três parasitas.	16
Figura 10: Mecanismo de transcrição génica nos tripanosomatídeos	17
Figura 11: Manipulação das vias de sinalização e fatores de transcrição e tradução do macrófago pela gp63 de <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 12: Quantificação de extratos pelo método de Bradford.	36
Figura 13: Composição do gel de acrilamida a 10%.	37
Figura 14: Procedimento do ensaio de sensibilização de Eh com extratos de <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i>	43
Figura 15: Estudo do efeito do complemento nos eritrócitos sensibilizados.	44
Figura 16: Perfil proteico total dos extratos de <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> em géis corados com azul de Coomassie (a) e nitrato de prata (b).	45
Figura 17: Perfil proteico total dos sobrenadantes das extratos de <i>Leishmania</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	46
Figura 18: Perfil enzimático, em colagénio, de extratos de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	48
Figura 19: Perfil enzimático, em gel de gelatina, de extratos de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	48
Figura 20: Perfil enzimático, em caseína, de extratos de <i>Leishmania</i> spp., <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	49
Figura 21: Inibição de colagenase de <i>Clostridium histolyticum</i> , em colagénio, com diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina.	50
Figura 22: Inibição de metaloproteases, em colagénio, de extratos de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. shawi</i> com diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina.	51
Figura 23: Inibição de metaloproteases, em colagénio, de extratos de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> Y, <i>T. cruzi</i> Bol. e <i>T. cruzi</i> QMM5 com diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina.	51

Figura 24: Atividade gelatinolítica do controlo positivo comparativamente à dos extratos de <i>Leishmania</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>T. b. brucei</i> ao longo de 28 h, à T.A.	52
Figura 25: Atividade gelatinolítica dos extratos de <i>Leishmania</i> spp., <i>T. cruzi</i> e <i>T. b. brucei</i> ao longo de 28 h, à T.A.	53
Figura 26: Efeito inibitório da atividade gelatinolítica do controlo positivo, pela 1,10-fenentrolina, ao longo de 28 h, à T.A.	54
Figura 27: Atividade gelatinolítica dos extratos de <i>Leishmania</i> spp. na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A.	54
Figura 28: Atividade gelatinolítica dos extratos de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A.	55
Figura 29: Atividade gelatinolítica dos extratos de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A.	56
Figura 30: Atividade gelatinolítica do extrato de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A.	56
Figura 31: Atividade total dos extratos e do controlo positivo em colagénio.	57
Figura 32: Efeito inibitório da atividade de collagenase, mediada por metaloproteases, do controlo positivo, por 0,1, 0,2 e 0,4 mM de 1,10-fenentrolina, ao longo de 28 h, à T.A.	58
Figura 33: Atividade dos extratos de <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma</i> em colagénio.	58
Figura 34: Atividade de collagenase dos extratos de <i>Leishmania</i> na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A.	59
Figura 35: Atividade de collagenase dos extratos de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A.	60
Figura 36: Atividade de collagenase dos extratos de tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A.	61
Figura 37: Atividade de collagenase de <i>Trypanosoma brucei brucei</i> na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina ao longo de 28 h à T.A.	61
Figura 38: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de <i>Leishmania</i>	63
Figura 39: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	64
Figura 40: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	64
Figura 41: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de <i>T. brucei brucei</i>	65
Figura 42: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de <i>Leishmania</i> na presença de 10 mM de EDTA e na ausência de iões de Ca^{2+} e Mg^{2+}	66
Figura 43: Efeito do complemento por 10 mM em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de <i>Leishmania</i> na presença de 10 mM de EDTA e na ausência de iões de Ca^{2+} e Mg^{2+}	66

Lista de abreviaturas

AP-1 - Proteína-1 ativada

cDNA - DNA complementar

CR1- Recetor do complemento 1

CR3 - Recetor do complemento 3

CMI – Concentração mínima inibitória

C3b - Componente 3b do sistema complemento

DMSO - Dimetilsulfóxido

D.O. – Densidade ótica

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas

DTU - Unidade discreta de tipagem

EC- Número de classificação

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERK1/2 - Cinases reguladas por sinais extracelulares 1/2

SFB – Soro fetal bovino

FnR- Recetores de fibronectina

gGAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

gp63 - Glicoproteína de 63kDa

His – Histidina

iC3b - C3b inativado

IFN- γ - Interferão gama

IgM - Imunoglobulina M

IL-12 - Interleucina-12

IRAK-1 - Cinase 1 associada ao recetor de interleucina-1

IUBMB - Comité de nomenclatura da união internacional de bioquímica e biologia molecular

JAK-2 - Cinase janus-2

JNK - Cinase N-terminal de c-Jun

LIT - *Liver Infusion Tryptose*
 LPG – Lipofosfoglicano
 MAPK - Cinase ativada por mitogénios
 MARCKS – Substrato de proteinase C rico em alanina miristoilada
 Mb – Megabase
 MMP – Metaloprotease de matriz de mamífero
 mRNA – RNA mensageiro
 MRP – Proteínas relacionadas com MARCKS
 MSP – Principal protease de superfície
 mTOR - mTOR - Alvo da rapamicina dos mamíferos
 NF- κ B - Fator nuclear κ B
 NK - *Natural Killer*
 NO – Óxido nítrico
 OMS - Organização Mundial de Saúde
 PBS – Tampão fosfato salino
 PIT - *Pancreas Infusion Tryptose*
 PDB – *Protein Data Bank*
 PLC - Fosfolipase C
 poli-A - Múltiplas adeninas
 PKC – Substrato da proteína cinase C
 PKDL- Leishmaniose post-kala-azar
 PTP - Proteína tirosina fosfatase
 PTP-PEST - PTP prolina, glutamato, serina e treonina
 p130CAS - Substrato P130 associado ao regulador CT10 de cinases
 RGDS – Sequência de arginina (R), glicina (G) e aspartato (D)
 RNA - Ácido ribonucleico
 RPMI - Roswell Park Memorial Institute
 SAP - Proteína ativada por stresse
 SDS - Dodecil sulfato de sódio
 Sh – Soro humano
 SHP-1 – *Src Homology-2 domain-containing Phosphatase-1*

SL- *Spliced leader*

SRYP - Serina, arginina, glicina e aspartato

STAT-1 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição-1

TCPTP - *T-cell PTP*

TEMED - tetrametiletilenodiamina

THA - Tripanossomose Humana Africana

TLR- Recetores *toll-like*

Th - *T helper*

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UTR - Regiões não codificantes

VBS⁺⁺ - *Veronal Buffer solution*

VERO – Linhagem celular extraída de rim de macaco (*Verda reno*)

1. Introdução

Os esforços no sentido de travar as inúmeras doenças que assolam a humanidade têm sido incessantes, apesar de, por vezes, seletivos dado serem, geralmente, aplicados com base em conveniências, de diferentes ordens, que se sobrepõem ao propósito a que se destinam. Não obstante este *modus operandis*, o combate às doenças infecciosas, embora ainda deficitário, é alvo de crescente interesse sendo a procura de novos fármacos e vacinas uma das principais estratégias adotadas no sentido de solucionar doenças provocadas por agentes infecciosos. Esta abordagem reveste-se de especial dificuldade uma vez que exige um profundo conhecimento de todo o processo de infeção, dos agentes etiológicos e de outros intervenientes, como vetores e reservatórios. Em particular, o combate às doenças parasitárias, embora urgente, tem vindo a revelar-se uma tarefa árdua pois, entre outros desafios, obriga à compreensão das complexas interações parasita-hospedeiro. Acresce ainda o facto de parte significativa destas doenças ser endémica em países de baixa renda, o que ocasiona desinteresse da comunidade industrial/farmacêutica por não serem lucrativas.

Do conjunto de circunstâncias apresentadas emerge uma conjuntura trágica. Até à presente data não foram ainda desenvolvidas vacinas para doenças parasitárias humanas provocadas por protozoários e helmintas e os fármacos atualmente disponíveis ou acarretam efeitos secundários severos ou são ineficazes devido ao surgimento de resistências (Charmoy *et al.*, 2009, Cecílio *et al.*, 2014).

Deste modo, afigura-se pertinente e de eminente relevância o estudo de parasitas responsáveis por Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN).

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas

O despertar para a problemática das DTN remonta aos primórdios da Organização Mundial de Saúde (OMS). Quando da sua fundação, no final da década de 40, estabeleceu-se um compromisso que visava a redução das DTN que perdura até à atualidade (WHO, 2013)

Sucintamente, as doenças incluídas neste grupo caracterizam-se por serem maioritariamente prevalentes em regiões tropicais e subtropicais onde impera a pobreza, designadamente nos continentes Africano, Asiático e América Central e do Sul. Não

obstante os esforços no sentido de as controlar/erradicar, atualmente as DTN são endémicas em 149 países e afetam mais de 1,4 mil milhões de indivíduos. Do total de países endémicos para DTN, em pelo menos 100 coexistem duas ou mais DTN (WHO, 2013).

A etiologia das 17 DTN declaradas pela OMS (2015) é diversa, podendo ser causadas por vírus (Dengue e Hidrofobia), bactérias (Úlcera de Buruli, Lepra, Tracoma e Treponematoses endémicas), helmintas (Cisticercose, Drancunculíase, Equinococose, Infecções alimentares transmitidas por trematódeos, Filariose linfática, Oncocercose, Esquistossomose e Helmintíases transmitidas pelo solo) e protozoários (Leishmanioses, Doença de Chagas e Doença do Sono).

Um aspeto singular da tríade de DTN provocadas por protozoários é o facto de os seus agentes etiológicos integrarem a mesma família taxonómica (família Trypanosomatidae). A continuação da investigação científica destas parasitoses resultará certamente em novas descobertas que virão a contribuir significativamente, mesmo que indiretamente, para a diminuição do flagelo das DTN.

1.2.Géneros de importância médica na família Trypanosomatidae

Os protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae (Baker, 1963) são protistas do filo Sarcomastigophora e subfilo Mastigophora que inclui os protozoários flagelados. Integram ainda a ordem Kinetoplastida (Honiberg, 1963) devido ao facto de possuírem junto ao corpo basal do flagelo ácido desoxirribonucleico (DNA, *DeoxyriboNucleic Acid*) mitocondrial altamente condensado, designado por cinetoplasto (Santos *et al.*, 2006, Teixeira *et al.*, 2012, Lukeš *et al.*, 2014).

Em combinação com as particularidades já referenciadas possuem uma única mitocondria ramificada, um sistema complexo de edição de ácido ribonucleico (RNA, *RiboNucleic Acid*), transcrição poliestrónica, *trans-splicing* de todos os transcritos de RNA mensageiro (mRNA, *messenger RNA*) e uma via glicolítica inerente aos glicossomas (Santos *et al.*, 2006, Teixeira *et al.*, 2012, Lukeš *et al.*, 2014).

Dos nove géneros que constituem esta família cinco são monoxenos, estando por isso, restritos a hospedeiros invertebrados; os restantes compreendem parasitas heteroxenos, ou seja, capazes de intercalar o seu ciclo de vida entre hospedeiros invertebrados e vertebrados (*Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum*) ou plantas

(*Phytomonas*) (Lopes *et al.*, 2010, Chandler & James, 2013). Somente *Trypanosoma* e *Leishmania*, classificados conforme representado na fig. 1, causam doença no Homem, pelo que são os únicos géneros de importância médica da família Trypanosomatidae (Santos *et al.*, 2005).

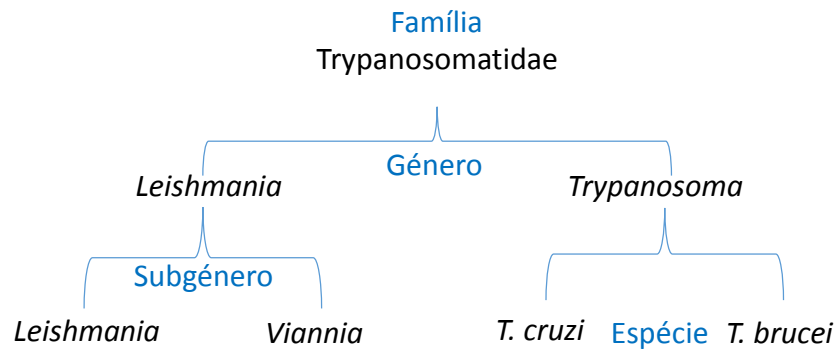


Figura 1: Classificação taxonômica de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Considerando o modo de transmissão das formas infetantes pelo vetor aos mamíferos, as espécies de *Trypanosoma* são agrupadas em duas secções: Stercoraria, se o parasita for transmitido através das fezes, e Salivaria, se for transmitida pela saliva (Hoare, 1964, Stevens & Gibson, 1999, Baral, 2010).

A diferenciação de géneros poderá ser estabelecida com base nas características morfológicas e ciclo de vida dos parasitas (Chagas, 1909). Dadas as limitações desta metodologia cinquentenária, recorre-se, para fins de classificação filogenética, à análise de marcadores genéticos que envolvem sequências génicas altamente conservadas tais como: a subunidade menor do *RNA* ribossomal (5S rRNA), genes que codificam para o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase glicossomal (gGAPDH, *glycossomal Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e repetições génicas do *spliced-leader RNA*. Os dois primeiros desvendam as principais subdivisões da família Trypanosomatidae mas não permitem o estabelecimento de relações entre e intra-espécies que o último possibilita (Lopes *et al.*, 2010, Maslov *et al.*, 2013, Votypka *et al.*, 2013).

Para a diferenciação entre espécies, subespécies ou estirpes é necessária a avaliação de características bioquímicas e ultra-estruturais (Besteiro *et al.*, 2007, Lopes *et al.*, 2010).

1.3.Principais formas morfológicas de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

Conforme representado na figura 2, no decorrer do ciclo de vida, os tripanossomatídeos apresentam diferentes morfotipos que se distinguem pela forma celular, dimensão e posição do complexo cinetoplasto-bolsa flagelar em relação ao núcleo. Destacam-se, pela sua importância no ciclo de vida dos parasitas em questão, as formas amastigota, promastigota, epimastigotas e tripomastigotas.

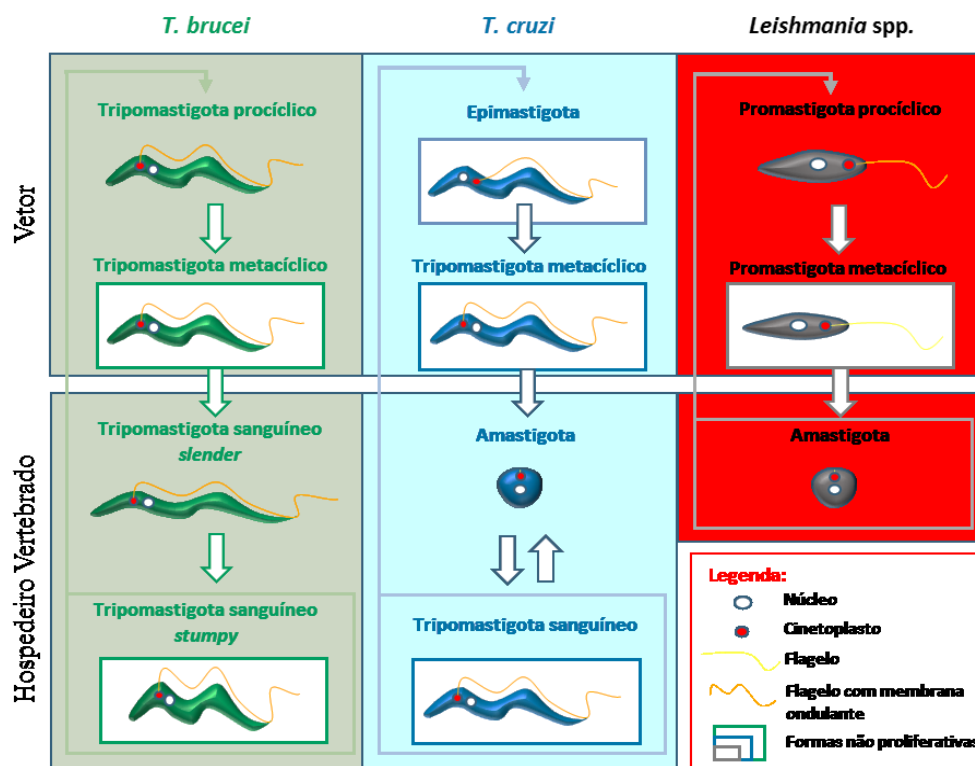


Figura 2: Diferentes formas morfológicas de *Leishmania* spp, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* apresentadas durante o ciclo de vida dos parasitas, que alterna entre o vetor e o hospedeiro vertebrado (adaptado de McConville *et al.*, 2002).

A forma promastigota é característica de *Leishmania* spp, enquanto que as formas epimastigota e tripomastigota são típicas de *Trypanosoma*. *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* são parasitas que no hospedeiro vertebrado adquirem a forma amastigota que é obrigatoriamente intracelular (Maslov *et al.*, 2013).

Epimastigotas, promastigotas e amastigotas são morfotipos em que o cinetoplasto se encontra numa posição anterior relativamente ao núcleo, contrariamente aos tripomastigotas onde o cinetoplasto se localiza na região posterior do parasita (d'Avila-Levy *et al.*, 2013, Maslov *et al.*, 2013).

Nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma* destaca-se ainda a presença de uma membrana ondulante que percorre, parcialmente, a superfície da membrana celular no sentido da região anterior do parasita. Esta membrana é formada pela ligação do flagelo ao corpo celular; unicamente na região posterior do parasita o flagelo se liberta (Baral, 2010). Nas restantes formas o flagelo apresenta-se livre, à exceção dos amastigotas cujo flagelo, é intracelular e de reduzida dimensão, terminando junto ao folheto interno da membrana celular (Vickerman, 1985) (d'Avila-Levy *et al.*, 2013, Maslov *et al.*, 2013).

A existência de diferentes formas morfológicas é resultado da pressão seletiva decorrente da exposição dos parasitas a variadas condições ao longo do seu ciclo de vida, uma vez que a sua ocorrência está limitada a um ambiente particular (Wheeler *et al.*, 2013).

O seu estudo, *in vitro*, é exequível embora não se aplique à totalidade das formas. Não obstante as limitações técnico-científicas impeditivas desta possibilidade, os métodos de cultura axénica para formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania*, formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e formas tripomastigotas de *T. brucei* já se encontram amplamente descritos na literatura (Lopes *et al.*, 2010). Neste tipo de cultura são recriadas as condições presentes no ambiente natural do parasita (Hsiao *et al.*, 2008). A título exemplificativo, para a obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* mimetizam-se-se as condições de stresse nutritivo que ocorrem no intestino do vetor e que forçam a morfogénese das formas epimastigotas em tripomastigotas (Kollien & Schaub, 2000, Tyler & Engman, 2000). Deste modo, é possível, numa cultura axénica, obter a diferenciação de formas tripomastigotas a partir de epimastigotas.

1.4. *Leishmania* spp. - Ciclo de vida, biologia do parasita e aspetos clínicos da infeção

Formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp. presentes nas válvulas faríngeas do vetor, são transmitidas pela picada de fêmea de flebótomo (ordem Diptera,

família Psychodidae e subfamília Phlebotominae) dos géneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (no Velho Mundo), quando da refeição sanguínea (Croft *et al.*, 2006, Maroli *et al.*, 2013).

Em resposta à presença de formas infetantes do parasita são recrutados neutrófilos para o local de inoculação; estes, por sua vez sinalizam as células dendríticas residentes nos tecidos periféricos e os macrófagos para que iniciem a fagocitose do parasita (Beattie & Kaye, 2011).

Nos macrófagos, o parasita diferencia-se em amastigotas que subsistem nos fagolisossomas onde se replicam, por fissão binária longitudinal, até à rutura da célula com libertação de novos parasitas que serão fagocitados por outros macrófagos, e assim sucessivamente (Awasthi *et al.*, 2004). Quando a fêmea do flebótomo volta a fazer uma refeição de sangue no hospedeiro vertebrado infetado ingere macrófagos parasitados. No vetor, as formas amastigotas ingeridas são libertadas no intestino (médio, no caso do subgénero *Leishmania*, ou posterior, no subgénero *Viannia*) durante o processo digestivo (Real *et al.*, 2013). Os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos que se multiplicam por divisão binária originando promastigotas metacíclicos. Os promastigotes metacíclicos migram para as válvulas faríngeas e destas para o proboscis, ficando disponíveis para serem depositados no hospedeiro quando da refeição seguinte (Afonso & Alves Pires, 2008).

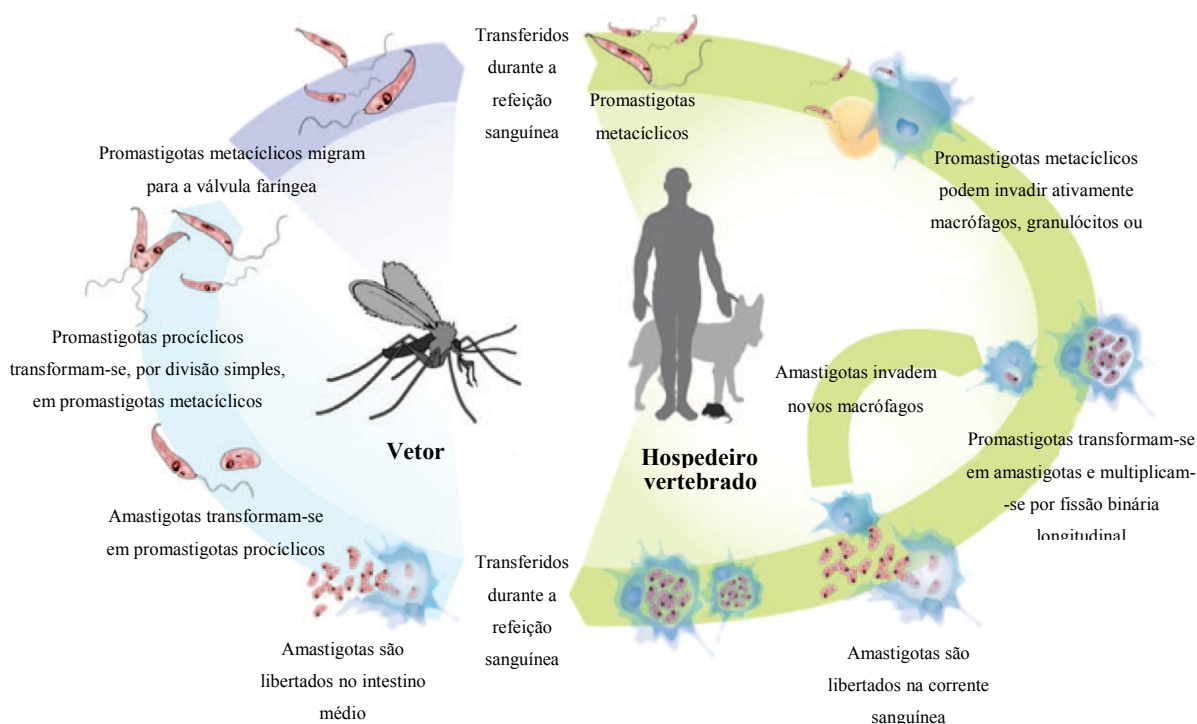


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (adaptado de Jennings *et al.*, 2013).

O sucesso e gravidade da infecção depende da suscetibilidade do hospedeiro vertebrado e da virulência do parasita que varia consoante a espécie e estirpe (Havelková *et al.*, 2006, Peacock *et al.*, 2007, Charmoy *et al.*, 2009, Olivier *et al.*, 2012) Em alguns casos o hospedeiro permanece assintomático por um longo período de tempo o que favorece a transmissão do parasita.

Do total de espécies de *Leishmania* spp. descritas, mais de 30, contabilizam-se, como patogénicas para o Homem 21 espécies (Peacock *et al.*, 2007, Ueno & Wilson, 2012). A doença pode apresentar-se na forma clínica de leishmaniose cutânea (difusa ou localizada), mucocutânea ou visceral [ou post-kala-azar (PKDL)] (Neuber, 2008).

A leishmaniose cutânea localizada caracteriza-se pela presença de úlceras circunscritas às áreas expostas do corpo e a difusa pela disseminação de lesões pela superfície corporal. Após a cura, muitas vezes espontânea, permanecem cicatrizes no local das lesões. É causada por espécies do velho mundo como *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* e por várias espécies do novo mundo, como por exemplo: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. shawi* (Peacock *et al.*, 2007, Charmoy *et al.*, 2009).

Na manifestação mucocutânea, podem ocorrer destruição total ou parcial das mucosas (nariz, boca e garganta) e das cartilagens (pavilhão auricular, palato e septo nasal). É causada essencialmente por espécies do Novo Mundo como *L. braziliensis* e *L. panamensis* (Peacock *et al.*, 2007, Charmoy *et al.*, 2009).

A leishmaniose visceral representa a forma mais grave da doença, uma vez que afeta órgãos internos, podendo culminar na morte. Resulta da infecção por *L. donovani* ou *L. infantum/chagasi* (Peacock *et al.*, 2007, Charmoy *et al.*, 2009).

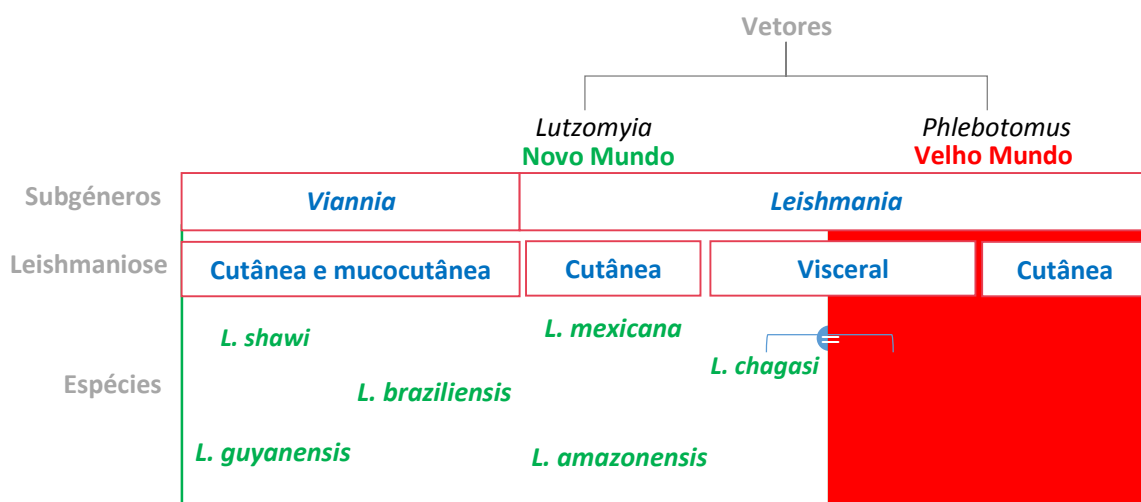


Figura 4: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral e respetivas espécies de *Leishmania* que as originam.

Estima-se a ocorrência de 1,3 milhões de novos casos anuais de leishmaniose e a morte de 20.000 a 30.000 de indivíduos infectados, anualmente, sendo a forma cutânea de leishmaniose mais frequente com incidência estimada de 0,7 a 1,3 milhões. A quase totalidade dos casos da doença, 95%, ocorrem na América, bacia do Mediterrâneo, Médio Oriente e Ásia central e destes mais de 2/3 distribuem-se pelo Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Irão e Síria (WHO, 2014).

À leishmaniose visceral devem-se 200.000 a 400.000 novos casos/ano de leishmaniose sendo altamente endêmica na Índia e África oriental. Mais de 90% dos novos casos ocorrem no Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do sul e Sudão. Relativamente à leishmaniose mucocutânea, quase 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Perú (WHO, 2014).

1.5. *Trypanosoma cruzi* - Ciclo de vida, biologia do parasita e aspetos clínicos da infeção

Formas tripomastigotas metacíclicas do parasita são transmitidas, tipicamente, pelas fezes de triatomíneos (ordem Diptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae) infectados, maioritariamente, durante a alimentação sanguínea (Trumper & Gorla, 1991).

Após ultrapassarem os primeiros obstáculos impostos pela imunidade inata, como pele ou mucosas do hospedeiro, os parasitas infetam células circundantes ao local de entrada, onde se diferenciam em amastigotas e se dividem por fissão binária. Quando em número superior ao suportável pela célula, fenómeno do qual decorre a lise da célula, são libertados na corrente sanguínea, onde se diferenciam em tripomastigotas, infetando novas células, como as do músculo cardíaco (Contreras *et al.*, 2006).

As formas tripomastigotas sanguíneas quando ingeridas pelo vetor transformam-se, no intestino médio, em epimastigotas. Os epimastigotas multiplicam-se e migram para o intestino posterior na forma de tripomastigotas metacíclicos que, por sua vez, são eliminados nas fezes as quais, se em contato com novo hospedeiro vertebrado, poderão reiniciar o ciclo infeccioso (Tyler & Engman, 2000).

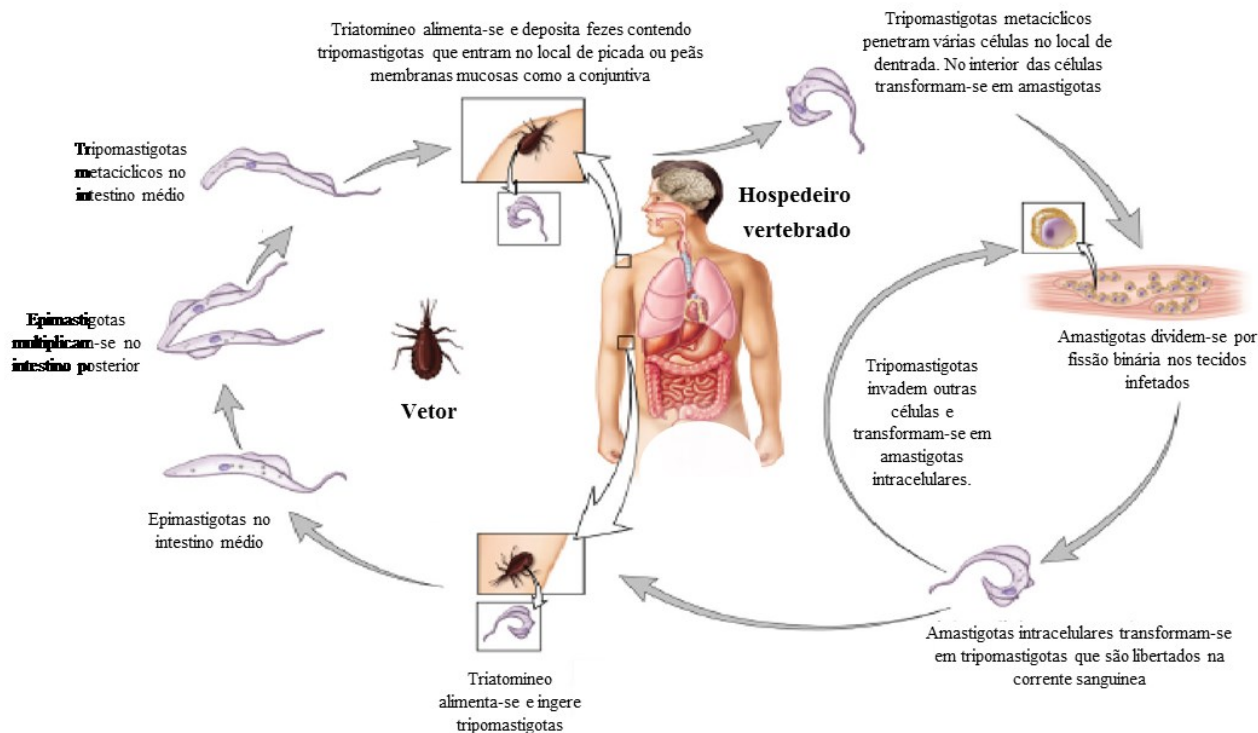


Figura 5: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (adaptado de Wheeler *et al.*, 2013).

As diferentes estirpes de *T. cruzi* são atualmente agrupadas em seis unidades discretas de tipagem (DTU, *Discrete Typing Units*), designadas de TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI (Lewis *et al.*, 2009, Zingales *et al.*, 2009, da Costa *et al.*, 2014). Internacionalmente reconhecida em 2009, a presente subdivisão não é consensual pois há divergências teóricas quanto às origens evolutivas de TcIII, TcIV, TcV e TcVI. Porém, TcI e TcII são unanimemente reconhecidos como os primeiros grupos ancestrais (Zingales *et al.*, 2009, Teixeira *et al.*, 2012, Zingales *et al.*, 2012).

Embora seja previsível uma futura reestruturação do atual sistema de classificação é incontestável a associação entre as diferentes DTU e as manifestações da doença e preferências pelo hospedeiro vertebrado (Westenberger *et al.*, 2005, Zingales *et al.*, 2009, Teixeira *et al.*, 2012, Zingales *et al.*, 2012).

Na fase aguda, a infecção por *T. cruzi* é geralmente assintomática (Teixeira *et al.*, 2006). Na fase crônica, que tem início 2 a 3 meses após a infecção, 40 a 50% dos pacientes progridem para cardiomiopatia progressiva e/ou distúrbios gastrointestinais (megaesófago e megacolon) (Rassi-Jr *et al.*, 2012, Zingales *et al.*, 2012).

A doença de Chagas é endêmica em 21 países da América latina e apresenta uma prevalência de 6 a 7 milhões de casos.

Estirpes integradas no grupo TcI são responsáveis pela maioria dos casos que ocorrem nas regiões endêmicas da América Central e da Amazônia Brasileira, Venezuela e Colômbia. Manifesta-se geralmente como doença aguda, com o desenvolvimento de lesões cardíacas e meningoencefalite. TcV e TcVI são, conjuntamente com TcII as causas predominantes de Doença de Chagas na América do Sul. Estirpes de TcI, embora associadas ao ciclo silvático da doença, pelo que são mais frequente em hospedeiros selvagens e vetores, estão também relacionadas com miocardite aguda grave em Humanos. TcII está relacionado com o ciclo doméstico; este DTU associado ao TcIV causa manifestações cardíacas e digestivas na população humana. As infecções por TcIII são raras na população humana. TcV é o DTU a mais comum na transmissão congênita da doença de Chagas (Zingales *et al.*, 2012, da Costa *et al.*, 2014).

1.6. *Trypanosoma brucei* - Ciclo de vida, biologia do parasita e aspetos clínicos da infeção

Formas tripomastigotas metacíclicas de *T. brucei* são transmitidas pela picada de mosca do género *Glossina* (ordem Diptera, família Glossinidae), vulgarmente designada de mosca tsé-tsé, infetada durante a alimentação sanguínea (International Glossina Genome Initiative, 2014).

Após entrada no hospedeiro os parasitas, inicialmente localizados no tecido dérmico, são enviados pelo sistema linfático para a corrente sanguínea onde se transformam em tripomastigotas sanguíneos longos e esguios (designados por formas *slender*) (Lopes *et al.*, 2010). Os tripomastigotas *slender* dividem-se e multiplicam-se dispersando-se por outros fluídos corporais como a linfa e líquido cefalorraquidiano acedendo ao sistema nervoso central do hospedeiro. Dependendo da carga parasitária, as formas *slender* evoluem para formas não proliferativas, mais curtas e largas denominadas por formas *stumpy* (Despommier *et al.*, 2005).

As formas sanguíneas *stumpy*, ingeridas pelo vetor durante a refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infetado, transformam-se, no seu intestino médio, em tripomastigotas procíclicos. Estes parasitas migram para as glândulas salivárias, dando origem às formas epimastigotas; estas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, que são posteriormente depositados na pele do hospedeiro vertebrado na próxima refeição de sangue, recomeçando ciclo infeccioso pelo parasita (WHO, 2014).

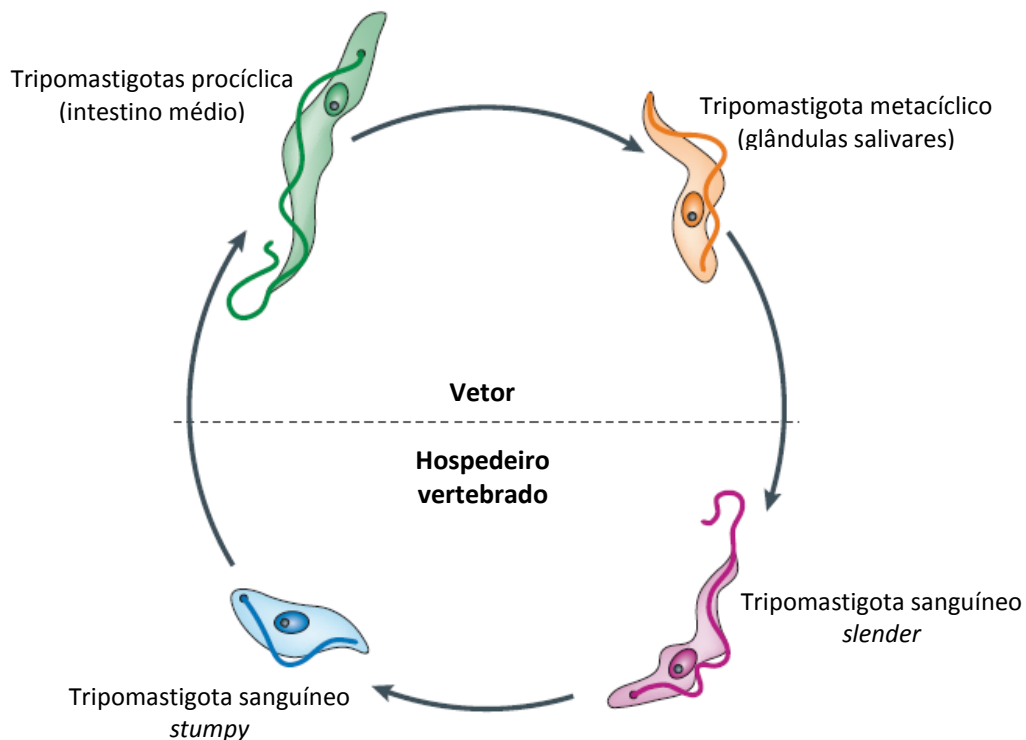


Figura 6: Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* (adaptado de Lee *et al.*, 2007).

A doença do sono está restrita ao continente Africano, pelo que é também designada de Tripanossomose Humana Africana (THA). Esta doença é causada por duas subespécies do parasita; *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense* (Mogk *et al.*, 2014).

Trypanosoma b. rhodesiense, circunscrito a 13 países da África Oriental, causa a forma mais grave e fulminante da doença. Em contrapartida, contribui com menos de 2% para o número total de casos de doença do sono. A THA causada por *T. b. gambiense* ocorre em 25 países da África Ocidental e, embora seja a responsável pela quase totalidade dos casos de doença do sono (mais de 98%), a forma clínica da doença é menos grave. A título de curiosidade, somente o Uganda apresenta as duas formas clínicas da doença (WHO, 2014).

Independentemente da etiologia da doença, ambas as formas clínicas apresentam duas fases; uma mais precoce, a hemolinfática e a mais tardia, meningoencefálica. Esta última fase da doença coincide com a invasão do sistema nervoso central pelo parasita desencadeando sintomatologia de extrema fadiga, também provocada pela desregulação

do ciclo circadiano (fenómeno que originou o nome “doença do sono”), e culminando em morte (Mogk *et al.*, 2014).

Na infecção por *T. brucei gambiense* a progressão para a última fase da doença pode demorar meses e prolongar-se durante anos. Na THA oriental a passagem à fase meningoencefálica ocorre em semanas e, uma vez alcançada, culmina em morte num curto espaço temporal de aproximadamente três meses (Lopes *et al.*, 2010). Deste facto deriva, curiosamente, a mnemónica de que na infecção por *T. b. gambiense* “o doente dorme antes de morrer” e que na doença decorrente da infecção por *T. b. rhodesiense* “o doente morre antes de dormir”.

Trypanosoma brucei brucei refere-se a uma sub-espécie de *Trypanosoma brucei* que, embora seja inócua em humanos, é patogénica para animais domésticos e selvagens. A infecção que ocasiona no gado é designada de Nagana e representa um obstáculo aos desenvolvimentos económico nas áreas rurais afetadas (WHO, 2014).

1.6. Metaloproteases de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Um elemento comum aos tripanossomatídeos é um tipo particular de endopeptidases, as metaloproteases, que para além de serem parte integrante do parasita desempenham também funções importantes na virulência dos parasitas e na patogenia das infeções.

Destas, destaca-se a glicoproteína de 63kDa (gp63); descrita nos anos 80, é considerada o principal antígeno de superfície expresso em promastigotas de *Leishmania* spp (MSP, *Major surface protease*) (Isnard *et al.*, 2012, d'Avila-Levy *et al.*, 2013). A sua presença é também reconhecida em *T. cruzi* e *T. b. brucei* (Grandgenett *et al.*, 2000, Isnard *et al.*, 2012)

A atividade da gp63 é comparável à das metaloproteases de mamíferos (MMP, *Matrix metalloproteinase*) com as quais partilham várias atividades, como a degradação de matriz extracelular, localização à superfície da célula, atividade proteolítica dependente de zinco e inibição da atividade por agentes quelantes (McGwire *et al.*, 2003).

1.6.1. Classificação das metaloproteases

As enzimas são, de acordo com o comitê de nomenclatura da união internacional de bioquímica e biologia molecular (IUBMB, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), agrupadas em 6 classes consoante o tipo de reação de catalisam. A cada uma é atribuído um número de classificação EC (*enzyme commission*) composto por quatro dígitos. O primeiro dígito indica a classe (por exemplo EC 1 corresponde a oxidoredutases e EC 3 a hidrolases), o segundo a subclasse (por exemplo 4 é referente a peptidase), o terceiro dígito refere-se ao grupo químico (por exemplo 21 é respeitante à serino-endopeptidase) que participa na reação e o último à enzima propriamente dita (Yao *et al.*, 2003).

A gp63 é, deste modo, reconhecida como EC 3.4.24.36. por ser uma peptidase (subclasse 4) integrada no grupo das hidrolases (Classe 3), que contém um ião de zinco no sítio ativo (24). A atribuição de um nome genérico não é contudo aplicável às peptidases uma vez que resulta da junção do nome dos substratos para os quais são específicas com o sufixo “ase”. Segundo este sistema, a gp63 é reconhecida com leishmanolisina (Santos *et al.*, 2006).

A incongruência detetada no sistema de nomenclatura do IUBMB é colmatada pelo sistema de classificação MEROPS, no qual a classe de uma proteinase é determinada pelo efeito de um inibidor proteolítico na sua atividade enzimática. Na sua base de dados estas enzimas são agrupadas em famílias com base em semelhanças estatisticamente significativas entre as sequências proteicas da unidade peptidase que é diretamente responsável pela atividade. Famílias que tenham origens evolutivas comuns e que possuam, ou se espera que apresentem, estruturas terciárias similares são agrupadas em clãs. A gp63, e suas homólogas, integram-se na família M8 do clã MA, da classe das metzincinas, que se caracterizam por serem metaloproteasas dependentes de Zn^{+} (Yao *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 2006, Besteiro *et al.*, 2007).

1.6.2. Estrutura da gp63 de *Leishmania* spp.

A gp63 é uma molécula compacta, de $45 \times 50 \times 70$ Å composta por três domínios: N-terminal, central e C-terminal (Schlagenhauf *et al.*, 1998).

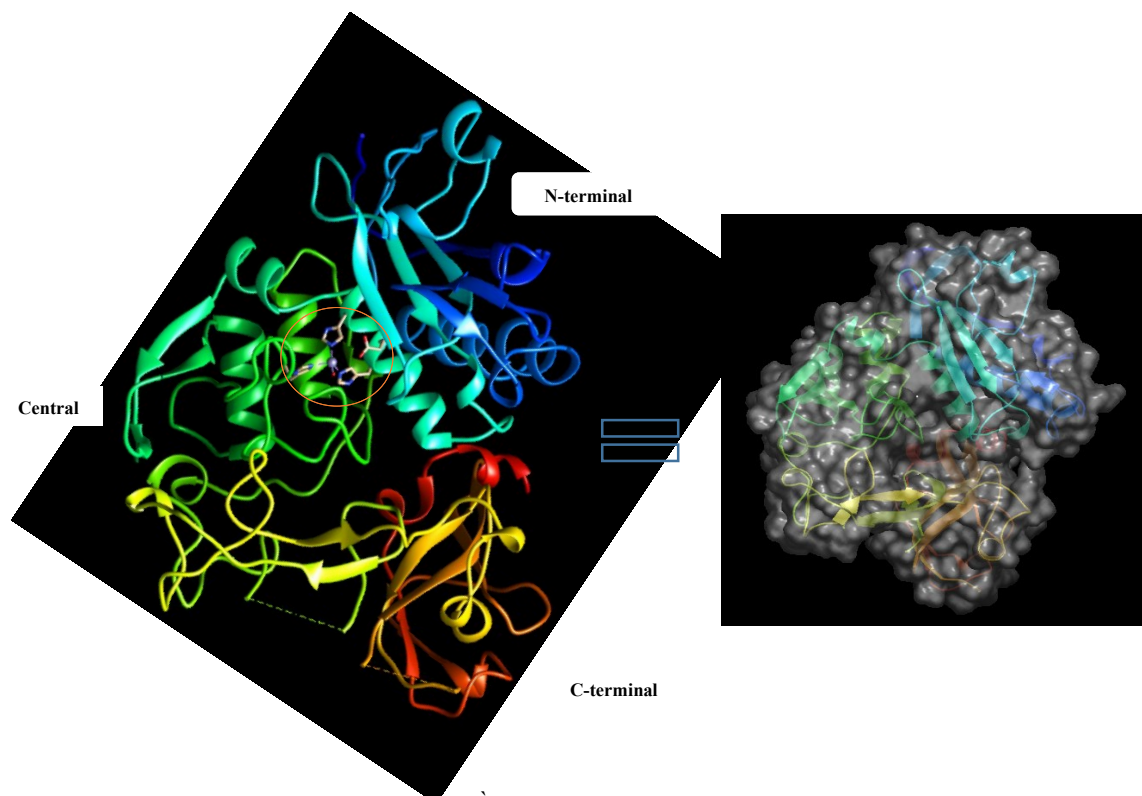


Figura 7: Estrutura tridimensional da gp63. À esquerda, a estrutura tridimensional do esqueleto proteico da gp63. Em tons de azul localiza-se o domínio N-terminal, em tons de verde o domínio central e em tons de amarelo e vermelho o domínio C-terminal. O centro catalítico encontra-se identificado por um círculo vermelho. À direita a pré-visualização da molécula (imagens construídas no *UCSF chimera 1.10* com base na sequência da gp63 de *Leishmania major*, 1LML, obtida no *Protein Data Bank* (PDB).

No domínio *N*-terminal encontra-se uma sequência conservada que contém um resíduo de cisteína ligado ao Zn^{2+} (ião zinco) que constitui o centro catalítico e que contribui para o mecanismo *cystein switch* (Bradford *et al.*, 1996, Isnard *et al.*, 2012). Este mecanismo impede a degradação dos componentes intracelulares do parasita pela enzima recém-sintetizada uma vez que a enzima só fica ativa após a disrupção do resíduo de cisteína. É também neste domínio que se localizam os resíduos que compõem o centro catalítico HGXXHXXGXH, comum a todas as enzimas da classe metzincina. Consiste em duas α -hélices projetadas contra uma folha- β composta por quatro fitas- α entrelaçadas (Schlagenhauf *et al.*, 1998, Razzazan *et al.*, 2008). O terceiro resíduo de histidina (His) é projetado para o interior do sítio catalítico, por uma pequena saliência que contém um resíduo de glicina (Schlagenhauf *et al.*, 1998, Bianchini *et al.*, 2006). Adjacente à primeira histidina encontra-se um resíduo de glutamina (Glu) responsável por atrair átomos de hidrogénio das moléculas de água (H_2O) até ao Zn^{2+} (Schlagenhauf *et al.*, 1998). Conforme representado na figura 8, a hidrólise de substrato só ocorre na presença do Zn^{2+} .

que está coordenado com as cadeias laterais das 3 histidinas localizadas na folha- β (Razzazan *et al.*, 2008).

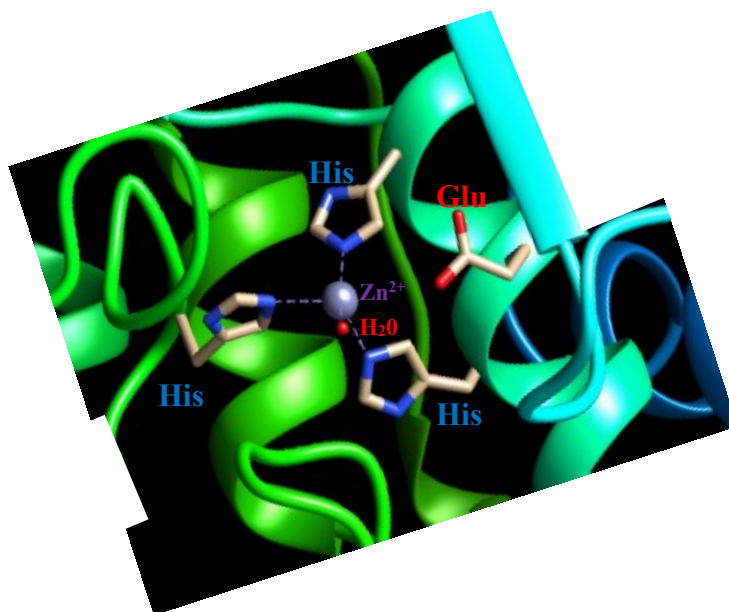


Figura 8: Composição do centro catalítico da gp63. Imagem construída no UCSF chimera 1.10 com base na sequência da gp63 de *Leishmania major*, 1LML, obtida no PDB.

O centro do domínio central é constituído por α -hélices e folhas- β antiparalelas. Uma ponte de dissulfeto estabelece a ligação ao subdomínio C-terminal (Razzazan *et al.*, 2008).

O domínio C-terminal possui seis das nove pontes de dissulfeto, o que indica que é uma estrutura extremamente rígida. A âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI, glycosylphosphatidylinositol) é adicionada aos últimos resíduos deste domínio e possui uma conformação similar a uma α -hélice. A sua adição depende do reconhecimento de um péptido-sinal (Matayoshi-Calixto *et al.*, 2014).

1.6.3. Regulação da expressão génica de gp63

Em 2005, as sequências genómicas de *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei* foram publicadas e designadas de genoma Tri-Tryp (El-Sayed *et al.*, 2005). Na Fig. 9 constata-se que, do total de *clusters* génicos que o constituem, 6200 *clusters* são partilhados entre os diferentes tripanossomatídeos (Peacock *et al.*, 2007). A análise da sequência genómica

contribuiu para a compreensão da biologia dos parasitas e da sua interação com os hospedeiros (Alvarez *et al.*, 2012, Teixeira *et al.*, 2012).

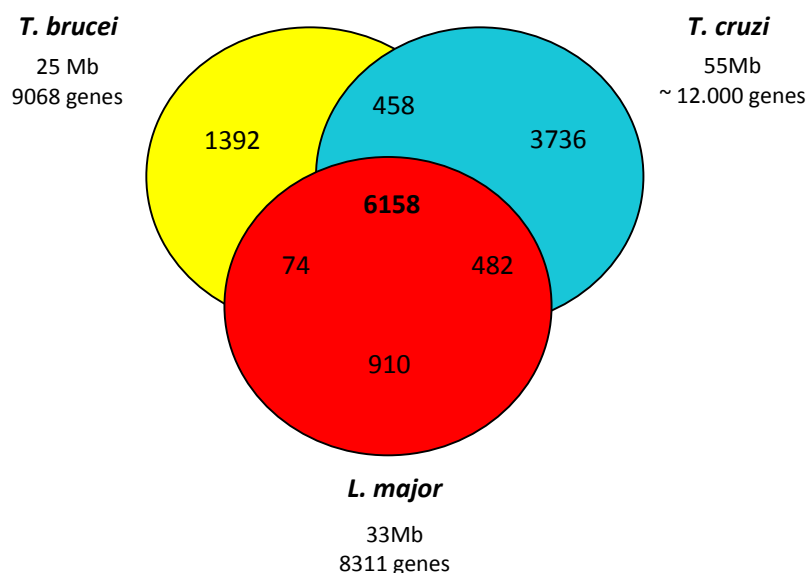


Figura 9: Tamannho estimado, em megabases (Mb), do genoma de *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* e respetivo número estimado de genes e distribuição de clusters de genes ortologos entre os três parasitas (adaptado de Kissinger, 2006).

Nos tripanossomatídeos, a transcrição dos genes não ocorre de forma individual, mas em grupos, ou seja, a transcrição é policistrónica (10 a 100 genes) à semelhança do que ocorre nas bactérias e ao contrário do que se verifica nos procariotas, os genes transcritos não estão funcionalmente relacionados (Kramer, 2012). Para além disso os genes transcritos podem ter origem nas duas cadeias de *DNA*, o que significa que a transcrição pode ocorrer simultaneamente em direções opostas (Papadopoulou *et al.*, 2003, Araújo *et al.*, 2011).

No genoma destes parasitas, a distribuição dos genes que codificam proteínas é aleatória, sendo pouco provável que ocorra seleção dos genes a serem transcritos. Na impossibilidade de reajuste da expressão génica à proteica, ocorrem múltiplas cópias dos mesmos genes, o que justifica a redundância de genes que codificam para a gp63. Esta característica também possibilita a obtenção de um elevado número de transcritos, o que contribui para a abundância da gp63 (Yao, 2010, Schwede *et al.*, 2012).

O nível de expressão de cada classe génica de gp63 é, no entanto, modulado em função da fase de crescimento do parasita, quando em cultura, e do seu estadio no ciclo de vida (Clayton & Shapira, 2007). Dado que não há correlação entre a expressão proteica e génica, depreende-se que o seu controlo se deva a mecanismos pós-transcricionais e pós-traducionais (Waller & McConville, 2002, Besteiro *et al.*, 2007).

Após transcrição génica, e em concordância com a figura 10, as múltiplas sequências codificantes que compõem o pré-*mRNA* policistrónico são individualizadas por *trans-splicing*, processo durante o qual é adicionada à extremidade 5' uma sequência designada de *spliced leader* (SL), composta por 39 nucleotídeos, e à extremidade 3' é adicionada uma cauda com múltiplas adeninas (poli-A), originando numerosas sequências de *mRNA* (Teixeira, 1998, Clayton, 2002, Yao *et al.*, 2003).

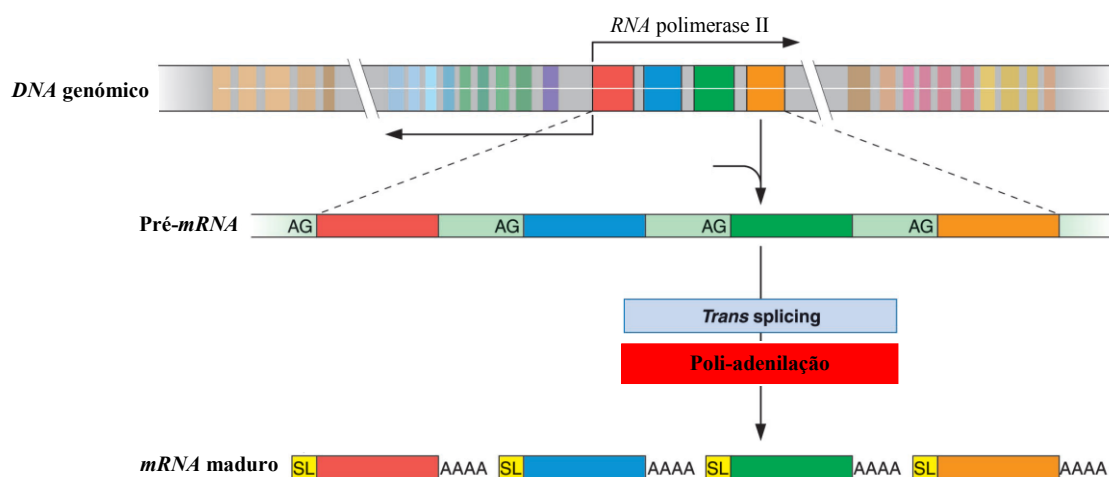


Figura 10: Mecanismo de transcrição génica nos tripanosomatídeos (Papadopoulos *et al.*, 2003).

Os transcritos de *mRNA* maduro compreendem, tanto a jusante como a montante das cadeias, regiões não codificantes (UTR, *untranslated region*). Diferenças nucleotídicas nas 3'UTR são um fator chave nos processos de regulação pós-transcricional, estando intrinsecamente relacionadas com a estabilidade do *mRNA* e, consequentemente com o controlo da tradução proteica, regulando desta forma a expressão de gp63 (Yao *et al.*, 2003, Siegel *et al.*, 2011).

As primeiras modificações pós-tradução desta proteína ocorrem após a síntese no retículo endoplasmático. Neste organelo, a gp63 é N-glicosilada sendo-lhe ainda incorporada uma âncora GPI mediante o reconhecimento do péptido-sinal localizado no

C-terminal seguido de clivagem (Yao *et al.*, 2004). Diferenças no estado de glicosilação da proteína são responsáveis pelos diferentes pesos moleculares que poderá exibir em gel de poliácridamida (González-Aseguinolaza *et al.*, 1997).

A pré-existência de um péptido-sinal, determinante para a incorporação da âncora de GPI na proteína, está intimamente relacionada com a forma morfológica do parasita; verifica-se, por exemplo, em *Leishmania* spp., que a sua presença e ausência está infalivelmente associada, o que não invalida a ocorrência de exceções, às formas promastigotas e amastigotas, respetivamente. Dada a sua influência na distribuição intracelular da proteína compreende-se o porquê de a sua localização ser distinta entre as diferentes formas dos parasitas (Yao *et al.*, 2004). Esta evidência permite inferir que a sua localização relaciona-se com as diferentes funções biológicas da enzima (McConville *et al.*, 2002).

Após as primeiras transformações pós-traducionais ocorridas no retículo endoplasmático, a gp63 é translocada para o complexo de golgi e deste para a bolsa flagelar, o único local de endocitose e exocitose destes parasitas (Ralton *et al.*, 2002, Baral, 2010). As formas membranares da proteína, as que contêm a âncora GPI, são exportadas para a superfície da membrana externa onde poderão ser libertadas por autotólise (McGwire *et al.*, 2002). Durante o processo de transporte, supõe-se que por vesículas que asseguram a rapidez deste processo, perdem o seu domínio N-terminal, correspondente ao pro-péptido, pelo que se encontram aptas ao exercício da sua atividade após a chegada ao local de destino (Ralton *et al.*, 2002, Yao *et al.*, 2003, 2004).

As formas livres, por serem solúveis no citosol, característica conferida pelo seu C-terminal hidrofílico, mantido intacto devido à inexistência da âncora GPI, são mantidas na bolsa flagelar onde são lentamente segregadas para o exterior (McConville *et al.*, 2002, Silva-Almeida *et al.*, 2012). Ou são reencaminhadas para o lisossoma, onde sofrem degradação, constituindo um mecanismo de regulação da expressão destas proteínas (McConville *et al.*, 2002, Waller & McConville., 2002).

Fatores externos ao parasita, como variações de temperatura ou de pH e contato com moléculas do hospedeiro podem atuar como estímulos que aumentam os níveis segregação da de enzima, quer pela sua excreção via bolsa flagelar quer através da libertação de gp63 ancorada à superfície (McGwire *et al.*, 2002, Yao *et al.*, 2007).

1.7.gp63 de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*: organização génica e expressão proteica

Não obstante a existência de múltiplos genes que codificam para gp63 verifica-se que a expansão génica difere consideravelmente entre os parasitas em questão. *T. cruzi* é o parasita com maior reportório génico. No seu genoma incluem-se mais de 420 genes MSP, o que contrasta com os 7 e 14 genes MSP que *L. infantum* e *T. brucei* apresentam, respetivamente (Yao *et al.*, 2007, Alvarez *et al.*, 2012). Embora não seja ainda possível atribuir um significado biológico às diferenças anteriormente expostas verifica-se a existência de uma correlação indireta entre o reportório génico de cada parasita e a sua atividade proteolítica; *T. cruzi* apresenta menor atividade proteolítica enquanto que em *Leishmania* spp. é bastante expressiva (Elias *et al.*, 2006, d'Avila-Levy *et al.*, 2013).

Sendo a gp63 comprovadamente um fator de virulência é natural que estas diferenças determinem a sua função no processo infeccioso, com repercussões na patologia associada a cada parasita (Gamboa *et al.*, 2008). Independentemente da espécie, o total de genes funcionais responsáveis pela codificação de gp63 é agrupado em classes mediante as diferenças encontradas nos seus 3'UTR, ou nas suas estruturas e sequências dos respetivos DNA complementares (cDNA, *complementar DNA*), e na sua expressão diferencial durante o ciclo de vida do parasita (Grandgenett *et al.*, 2000, Cuevas *et al.*, 2003, Yao *et al.*, 2003, Peacock *et al.*, 2007).

1.7.1. gp63 de *Leishmania* spp.

A complexidade génica no género *Leishmania* é distinta entre os diferentes subgéneros. As espécies integradas no Subgénero *Viannia* dispõem de maior variedade de genes MSP, que poderá ser até quatro vezes superior, relativamente ao subgénero *Leishmania* (Victoir *et al.*, 2005, Peacock *et al.*, 2007).

O número de genes apresentados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, 36 e 22 genes respetivamente, contrasta com os estimados em espécies do subgénero *Leishmania* como *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*, que apresentam seis, sete e oito genes, respetivamente (Yao *et al.*, 2003, Silva-Almeida *et al.*, 2014). As diferenças numéricas que possam vir a ser detetadas após comparação com outros autores/publicações devem-se, provavelmente, à utilização de diferentes estirpes.

A gp63 de *Leishmania* spp. é abundantemente expressa em promastigotas, atingindo o seu auge em promastigotas metacíclicas. Nas formas amastigotas, intracelulares, a sua expressão, embora fraca, é detetável (d'Avila-Levy *et al.*, 2013).

Estudos efetuados em promastigotas de *L. mexicana* revelaram que 75% do total de enzima encontra-se distribuída por toda a superfície do parasita, incluindo o flagelo, localizando-se o restante intracelularmente (Yao *et al.*, 2007, Lambertz *et al.*, 2012).

Estudos complementares, efetuados com formas promastigotas de *L. major* mantidas em cultura estimam que, quando na fase de crescimento mais virulenta, a fase estacionária, equivalente às formas promastigotas metacíclicas, ocorra a produção de mais de 500.000 cópias de gp63, o que equivale a 1% do seu conteúdo proteico total. Nas formas amastigotas, este valor decresce para 0,1% sendo esta redução, no entanto, parcialmente compensada pela ausência de lipofosfoglicano (LPG, *Lipophosphoglycan*) (proteína altamente expressa em promastigotas) à superfície da membrana o que possibilita a sua maior exposição a fatores externos ao parasita (Yao *et al.*, 2007, Hsiao *et al.*, 2008, Olivier *et al.*, 2012).

O elevado número de moléculas de gp63 membranares em promastigotas metacíclicas tal como a sua presença nas formas amastigotas, embora de modo menos representativo, é um requisito obrigatório para a eficaz manipulação do sistema imunitário e consequente bem-sucedido estabelecimento da infeção, aquando da sua inoculação no hospedeiro.

Após a entrada de *Leishmania* spp. no hospedeiro, células fagocíticas residentes no tecido circundante, tais como macrófagos e células dendríticas, iniciam a sua tentativa de eliminação do parasita (Cecílio *et al.*, 2014). Dada a sua incapacidade para a contenção local do mesmo emitem sinais quimiotáticos que visam o recrutamento de mais células para o eficaz controlo e erradicação do parasita.

Leishmania spp. dispõe, contudo, de mecanismos que subvertem as estratégias adotadas pela imunidade inata do hospedeiro (Fig. 11).

O aliciamento de neutrófilos, as primeiras células responsivas ao chamamento quimiotático, é elucidativo da capacidade manipuladora do parasita (Allenbach *et al.*, 2006). Estas células polimorfonucleadas apresentam, *per se*, um tempo de vida bastante limitado que culmina com a sua autodestruição, por apoptose; os detritos resultantes deste processo são removidos por macrófagos que os fagocitam.

Numa primeira fase, após a internalização do parasita pelo processo que lhes é inerente, a fagocitose, o tempo de vida dos neutrófilos é substancialmente prolongado

(Charmoy *et al.*, 2009). Esta sua faculdade permite a obtenção de um refúgio onde se podem multiplicar silenciosamente e em simultâneo aguardar o recrutamento de um maior número de células apresentadoras de antigénio, designadamente macrófagos e células dendríticas (Cecílio *et al.*, 2014).

Após a tardia, mas inevitável, apoptose da célula, nichos de *Leishmania* spp. intacta, ocultos nos corpos apoptóticos dos neutrófilos, são fagocitados por macrófagos, o seu hospedeiro celular definitivo, sem que ocorra a ativação de processos que visam a sua imediata destruição (Awasthi *et al.*, 2004, Liu & Uzonna, 2012). A assunção de que os neutrófilos são manipulados ao ponto de adotarem um comportamento análogo ao do “cavalo de troia”, designação que lhes é atribuída na literatura, é contudo revogada por alguns autores que defendem que, aquando da sua destruição, os parasitas são libertados e fagocitados isoladamente, ou seja, sem recurso a esta técnica de dissimulação (Charmoy *et al.*, 2009, Kaye & Scott, 2011).

Para além da existência de uma via silenciosa de entrada no macrófago, o acesso de *Leishmania* spp. ao fagossoma do macrófago depende do reconhecimento por recetores de fagocitose. O sistema complemento, em conjunto com os restantes elementos da imunidade inata, colabora na tentativa de eliminação das formas promastigotas do parasita através, independentemente de ser ativada pela via clássica ou alternativa, da formação de um complexo de ataque à membrana. *Leishmania* spp. consegue, contudo, evitar a lise mediada pelo complemento através da inativação do componente C3b que é convertido, pela gp63, em iC3b (C3b inativado). Tanto o C3b como o iC3b podem atuar como opsoninas, contribuindo para a internalização do parasita pelos macrófagos mediante o reconhecimento dos recetores de complemento 1 (CR1, *Complement Rceptor 1*) e 3 (CR3, *Complement Rceptor 3*), respetivamente (Pandey *et al.*, 2004, Ueno & Wilson, 2012). Este último recetor assume maior importância no processo infeccioso dada a efemeridade do primeiro e o facto de não despoletar mecanismos oxidativos no interior do macrófago, o que constitui uma vantagem para o parasita (Liu & Uzonna, 2012). A gp63 contribui igualmente para reconhecimento direto do parasita pelo macrófago. Possui um motivo SRYD (serina, arginina, glicina e aspartato), análogo à região RGDS (sequência de arginina, glicina e aspartato) da fibronectina, que viabiliza a sua adesão à célula fagocítica através dos recetores de fibronectina (FnR, *Fibronectin Receptors*) (Brittingham *et al.*, 1999, Pandey *et al.*, 2004, Ueno & Wilson, 2012).

A internalização de *Leishmania* spp. pelo macrófago poderá também ocorrer via microdomínios lipídicos, presentes em toda a extensão da membrana do macrófago,

baseando-se este processo na afinidade da âncora de GPI da gp63 para com estes domínios (Denny & Smith, 2004).

A multivalência da gp63 evidencia-se também na sua capacidade em degradar diferentes péptidos e substratos proteicos tais como caseína, gelatina, colagénio, albumina, fibrinogénio e hemoglobina. A matriz extracelular do macrófago é deste modo suscetível à hidrólise pela enzima em questão, o que favorece a migração do parasita no seu interior; o mesmo se verifica com as formas recém-inoculadas no tecido subcutâneo aquando do início da infeção que poderão, desta forma, aceder aos fibroblastos, inclusive os dos nódulos linfáticos (McGwire *et al.*, 2003).

Após a sua ligação ao macrófago, o parasita é internalizado em endossomas sendo que, da sua fusão com os fagossomas, resulta a formação de fagolisossomas (Awasthi *et al.*, 2004). Dada a vulnerabilidade das formas promastigotas ao ambiente ácido característico dos fagolisossomas, a maturação endossomal é retardada para permitir a diferenciação de amastigotas, forma morfológica mais resistentes às condições ambientais do fagolisossomas (Cecílio *et al.*, 2014). A morfogénese ocorrida é também favorecida pela elevada temperatura do hospedeiro (37°C) quando comparada com a do vetor (~25°C) (Wenzel *et al.*, 2012, Hassani *et al.*, 2014).

Nas formas amastigotas, a presença de gp63 contribuiu irrefutavelmente para a sobrevivência do parasita no macrófago através, por exemplo, da inibição, direta ou indireta, de vias de sinalização responsáveis pela produção de fatores pró-inflamatórios e da inibição de fatores de transcrição e tradução que contribuem igualmente para este tipo de resposta (Olivier *et al.*, 2005). Dada a sua capacidade de produção de exossomas, que contêm entre outros elementos a gp63, destinados à fusão com a membrana do fagolisossoma, conseguem, por esta via, proceder à libertação de gp63 no citoplasma do macrófago habilitando-a, deste modo, a atuar como reguladora da atividade funcional desta célula (Olivier *et al.*, 2005, Lambertz *et al.*, 2012, Silverman & Reiner, 2012). A gp63 em circulação no citoplasma também poderá ser proveniente das formas promastigotas (Hassani *et al.*, 2014).

No citoplasma do macrófago, a gp63 é responsável pela hidrólise de substratos da proteína cinase C (PKC, *Protein Kinase C*), como é o caso do substrato de proteinase C rico em alanina miristoilada (MARCKS, *Myristoylated Alanine-Rich C-Kinase Substrate*) e das proteínas relacionadas com MARCKS (MRP, *MARCKS-Related Proteins*) (Bhardwaj *et al.*, 2010). A referida cinase está envolvida na transdução de sinal associada à proliferação, diferenciação e apoptose celular. A inativação da sinalização

através da PKC repercute-se na diminuição dos níveis das espécies reativas de oxigénio (ROS, *reactive oxygen species*) (Olivier *et al.*, 2005). PKC atua, igualmente, na regulação da maquinaria nuclear do proteossoma, promovendo a rápida degradação do transdutor de sinal e ativador de transcrição-1 (STAT-1, *Signal Transducer and Activator of Transcription -1*). A redução deste fator de transcrição implica a inibição, conjuntamente com outros fatores, da via cinase janus-2 (JAK-2, *JAnus kinase 2*) /STAT-1 (Bhardwaj *et al.*, 2010). Esta via é importante na mediação da sinalização da produção de interferão (IFN)- γ , o indutor da síntese de diversos agentes antimicrobianos incluindo o óxido nítrico (NO, *Nitric Oxide*) (Olivier *et al.*, 2005, Shio *et al.*, 2012). A par de PKC, são também responsáveis pela inibição da via JAK-2/STAT-1 três proteínas tirosinas fosfatases (PTP): SHP-1 (*Src Homology-2 domain-containing Phosphatase-1*), PTP1B e TCPTP (*T-cell PTP*) (Olivier *et al.*, 2005). As PTP são reguladores negativos cuja ativação é mediada por gp63 através da clivagem do C-terminal (Isnard *et al.*, 2012, Lambertz *et al.*, 2012, Hassani *et al.*, 2014).

A PTP SHP-1 intervém igualmente na inativação da cinase 1 associada ao recetor de interleucina-1 (IRAK-1, *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) e das cinases ativadas por mitogénios (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*) (Abu-Dayyeh *et al.*, 2008, Lambertz *et al.*, 2012). A primeira é considerada uma cinase central na via dos recetores *toll-like* (TLR, *toll-like receptors*) pelo que a sua inativação desencadeia o bloqueio da indução de intervenientes importantes na imunidade inata tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF α , *Tumor Necrosis Factor alpha*), NO e interleucina-12 (IL-12) (Olivier *et al.*, 2012). MAPK refere-se a um conjunto de cinases das quais se destacam as cinases reguladas por sinais extracelulares 1/2 (ERK1/2 *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*), P38 e as proteínas ativadas por stresse/cinase N-terminal de c-Jun (SAP/JNK, *Stress-Activated Arotein kinases/c-Jun N-terminal kinase*). Os seus membros participam na regulação de várias atividades celulares sendo a função a que se destinam, e sua ativação, dependente de estímulos externos (Hallé *et al.*, 2009).

A redução das MAPK traduz-se na baixa produção de proteína-1 ativada (AP-1, *Activated Protein-1*), um fator de transcrição de agentes pró-inflamatórios composto por homodímeros da família Jun (c-Jun, JunB e JunD) ou por heterodímeros de membros das famílias Jun e Fos (c-Fos, Fos B, Fra 1 e Fra 2) (Karine *et al.*, 1997, Contreras *et al.*, 2010). A inibição de ERK1/2, P38 e SAP/JNK provoca a alteração da transdução de sinal nas vias que c-Fos e c-Jun integram, resultando este acontecimento na redução transnuclear de AP-1 (Shio *et al.*, 2012). A diminuição dos níveis citoplasmáticos e

nucleares de AP-1, e suas subunidades, é também devida à clivagem direta por gp63 (Contreras *et al.*, 2010). Para além do impacto que exerce no macrófago, a inibição de ERK1/2 interfere ainda na regulação da apoptose do neutrófilo. A fosforilação de ERK1/2 é um evento chave no adiamento da apoptose que é benéfico para a sobrevivência do parasita (Cecílio *et al.*, 2014).

A gp63 exerce influência num terceiro fator de transcrição, o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$, *Nuclear Factor $\kappa\beta$*). Este é composto por várias subunidades, entre elas NF- $\kappa\beta$ p65RelA que é clivada pela gp63 originando o fragmento NF- $\kappa\beta$ p35RelA e NF- $\kappa\beta$ p50RelA. Da junção das duas últimas resulta a formação de um dímero que migra para o núcleo da célula, onde exerce a indução seletiva de uma panóplia de quimiocinas. Dada esta particularidade, que se repercute no recrutamento de células efectoras, é considerado um fator essencial na mediação entre a imunidade inata e adaptativa (Olivier *et al.*, 2012, Silva-Almeida *et al.*, 2012).

A combinação da manipulação, pela gp63, dos fatores de transcrição STAT-1, AP-1 e NF- $\kappa\beta$ contribui para a diminuição da resposta pró-inflamatória e atividade antimicrobica do macrófago (Olivier *et al.*, 2012).

A regulação do sistema de tradução do macrófago, sob influência da gp63, ocorre ao nível do avlo da rapamicina dos mamíferos (mTOR, *mammalian Target Of Rapamycin*), um regulador negativo do início da tradução (Shapira & Zinoviev, 2011). A sua clivagem por gp63 ocasiona a desfosforilação de 4E-BP1 o que acarreta efeitos ao nível da síntese proteica de IFN α/β (Jaramillo *et al.*, 2011, Lambertz *et al.*, 2012).

No decurso da infeção por *Leishmania* spp. ocorre a redução da produção de IFN- γ pelas células NK (*Natural Killer*) devido à ação da gp63. Dado não serem células fagocíticas, o acesso da enzima ao seu interior encontra-se interdito, pelo que o contato entra ambas dever-se-á, presumivelmente, à excreção de exossomas pelo parasita em local próximo das células. (Lieke *et al.*, 2008, Olivier *et al.*, 2012).

Relativamente aos fibroblastos, estes são parte integrante do tecido conjuntivo que, por sua vez, constitui a estrutura de sustentação de diversos órgãos ou composições orgânicas, entre elas, os nódulos linfáticos. À semelhança do que se verifica no macrófago, a gp63 consegue subverter as vias de sinalização em seu benefício manipulando as funções regulatórias. Na base deste processo encontra-se a clivagem pela gp63 do substrato P130 associado ao regulador CT10 de cinases (p130CAS, *CT10 regulator of kinase (Crk)-Associated Substrate*) e PTP prolina, glutamato, serina e treonina (PEST, *Pro-Glu-Ser-Thr*) envolvidos no rearranjo do citoesqueleto. Sendo os

fibroblastos destituídos de capacidades microbicidas, a reestruturação do citoesqueleto providencia um ambiente otimizado para que possam atuar como reservatórios do parasita. A localização destes reservatórios é estratégica dada a proximidade ao centro nevrálgico da imunidade inata e por conseguinte, também da adaptativa, onde poderão intervir de forma favorável à sua sobrevivência. (Bogdan *et al.*, 2000, Lambertz *et al.*, 2012).

Embora a gp63 exerça influência na regulação de diferentes componentes da imunidade inata é incontestável que, sob o seu controlo, estes respondem unisonamente no sentido de obtenção de uma resposta anti-inflamatória. Estudos em murganhos BALB/c, modelo animal geneticamente predisposto à infecção por *Leishmania* spp., revelaram que a progressão da doença é favorecida por respostas anti-inflamatórias, também indicadas como respostas *t helper* (Th) 2. Contrariamente, a resolução da infecção implica a indução de uma resposta pró-inflamatória ou Th1. Embora seja arriscado a extrapolação dos resultados do modelo animal para a infecção humana, é irrefutável que a o predomínio de resposta Th2 revela a importância crucial da gp63 na progressão da infecção e no desenvolvimento da doença (Sacks & Noben-Trauth, 2002, Awasthi *et al.*, 2004, Tripathi *et al.*, 2007).

No hospedeiro invertebrado, o vetor de *Leishmania* spp., a gp63 possibilita a obtenção de nutrientes, pelo parasita, através da hidrólise de substratos proteicos. A capacidade proteolítica da enzima é igualmente favorável à mobilidade de *Leishmania* spp. no seu interior e à sua sobrevivência (Sádlová *et al.*, 2006, Yao *et al.*, 2007).

1.7.1. gp63 de *Trypanosoma cruzi*

São parte integrante do genoma de *T. cruzi* aproximadamente 425 genes MSP; destes, 251 correspondem a pseudogenes. Dos 174 genes restantes há evidências de que 29 são expressos (d'Avila-Levy *et al.*, 2013). O total de genes MSP é agrupado em três grupos: *Tcgp63-I*, *Tcgp63-II* e *Tcgp63-III*. Sendo o último constituído essencialmente por pseudogenes. *Tcgp63-II* apresenta maior abundância génica. Esta abundância é, no entanto, contrária à sua importância biológica. O nível de transcritos é pouco expressivo e não preveem um local de adição de âncora GPI, pelo que a proteína não é expressa à superfície do parasita. *Tcgp63-I* é o único grupo que está envolvido no processo infeccioso causado por *T. cruzi*. Quatro dos transcritos deste grupo são diferencialmente regulados nos diferentes estadios do parasita, sendo mais abundantes em amastigotas do que em



Figura 11: Manipulação das vias de sinalização e fatores de transcrição e tradução do macrófago pela gp63 de *Leishmania* spp.

epimastigotas e tripomastigotas. Contrariamente ao que se verifica com o segundo grupo, a enzima produzida contempla um local de adição de âncora GPI, ligando-se assim à membrana do parasita onde é proteoliticamente ativa (Grandgenett *et al.*, 2000, Cuevas *et al.*, 2003, Kulkarni *et al.*, 2009).

A contribuição da gp63 na infecção por *T. cruzi* é menos representativa do que em *Leishmania* spp. Este facto não invalida, contudo, a sua relevância no processo infeccioso. Contudo são escassos os estudos que procuraram detalhar a interação da gp63 e a progressão da infecção. Porém, experiências realizadas em linhagem celular extraída de rim de macaco (VERO - *verda reno*) permitiram concluir que a ausência de gp63, conseguida através do seu bloqueio com anticorpos anti-gp63, implica uma redução de 50%, da invasão celular (Cuevas *et al.*, 2003).

1.7.2. gp63 de *Trypanosoma brucei*

Do total de genes MSP de *T. brucei* 5 são integrantes da classe génica *TbMSP-A*, 4 são pertencente à classe *TbMSP-B* e 3 incluem-se na classe *TbMSP-C*. As sequências de aminoácidas da MSP partilham 33% de homologia com a gp63 de *Leishmania* spp., fundamentam idêntica estrutura tridimensional.

As regiões menos conservadas entre as diferentes classes, localizadas nos domínios C-terminal da gp63, são responsáveis pela natureza hidrofóbica do referido domínio nas duas primeiras classes e hidrofílica na classe *TbMSP-C*. A produção de gp63 associada às membranas está associada aos genes das classes *TbMSP-A* e *TbMSP-B* (LaCount *et al.*, 2003). Nas formas tripomastigotas sanguíneas deteta-se a expressão das três classes génicas porém, nas formas procíclicas são, exclusivamente detetados transcritos de *TbMSP-B* (Yao *et al.*, 2003).

Independentemente da sua localização no parasita ou da forma morfológica a que se encontra associada, a gp63 de *T. brucei* está impossibilitada de exercer funções análogas às descritas em *Leishmania* spp. ou em *T. cruzi*, por ser um parasita extracelular (El-Sayed & Donelson, 1997, Yao, 2010).

O facto de se encontrar continuamente exposto ao sistema imunitário do hospedeiro não invalida, contudo, a persistência do parasita e o sucesso da infecção. Para esta resiliência parasitária contribui veementemente a capacidade de variação antigénica. Neste processo, as formas sanguíneas alternam, ciclicamente, a principal proteína de

superfície, a glicoproteína variável de superfície (VSG, *Variable surface glycoprotein*), perpetuando a presença de *T. brucei* no hospedeiro (Donelson *et al.*, 1998).

As formas sanguíneas do parasita contêm milhares de antígenos invariáveis e inacessíveis aos componentes da imunidade do hospedeiro devido à presença de aproximadamente 10 milhões de cópias de uma determinada VSG que os ocultam (Bangs *et al.*, 1997, Donelson *et al.*, 1998, Gruszyński *et al.*, 2003, Baral, 2010). Em resposta à sua presença é ativada, no hospedeiro, a produção policlonal de células B, do tipo IgM (Imunoglobulina M), anti a VSG que é expressa no momento da infecção (Manna *et al.*, 2014). Porém, a lise por anticorpos é dependente de elementos do sistema complemento e as células *stumpy* são mais resistentes a este tipo de lise do que as *slender*, pelo que ocorre primeiramente o decréscimo da população de tripomastigotas *slender* enquanto as formas *stumpy*, resultantes da morfogénese das células *slender*, asseguram o pico da parasitémia contribuindo, em simultâneo, para o aumento do potencial de transmissão ao vetor. Dada a ausência de capacidade replicativa, as formas *stumpy* são eventualmente removidas pela incessante atividade do sistema imune ou por, simplesmente, se tornarem senescentes (MacGregor *et al.*, 2012). O surgimento de uma nova população de células *slender*, resultado da ocorrência de variação antigénica, numa das células remanescentes, e a consequente expressão de uma nova VSG, assegura a ocorrência de uma nova vaga de parasitémia (Teixeira, 1998).

Da perspetiva do parasita é igualmente benéfica a sua perpetuação no hospedeiro tal como a sua transmissão a um novo vetor.

No hospedeiro invertebrado, durante a diferenciação das células *stumpy* em tripomastigotas procíclicos, ocorre a remoção da VSG e a expressão de um número equiparável de prociclinas, o principal antígeno de superfície das formas procíclicas que é resistente à ação de proteases (McConville *et al.*, 2002, Gruszyński *et al.*, 2003, Gruszyński *et al.*, 2006). A expressão da VSG à superfície do parasita é dependente de uma âncora GPI cuja remoção pode ocorrer por hidrólise, exercida pela ação da GPI-fosfolipase C (PLC, *Phospholipase C*), e por endoproteólise, mediante a ação da gp63 (Gruszyński *et al.*, 2003, d'Avila-Levy *et al.*, 2013). A atuação destas enzimas é sinérgica pois quando dissociadas assiste-se ao decréscimo da eficiência deste processo e na ausência de ambas verifica-se a incapacidade do parasita em se diferenciar, acompanhado da não remoção da VSG. Embora atuem de forma combinada, GPI-PLC e gp63 são diferencialmente reguladas no processo de remoção da VSG. Primeiramente, a GPI-PLC é ativada nas formas *stumpy*. Iniciada a diferenciação nas formas procíclicas, os níveis de

GPI-PLC decrescem e ocorre a produção massiva de gp63 que dará continuidade à remoção da VSG e assegurará a sua inexistência nas formas tripomastigotas procíclicas (Grandgenett *et al.*, 2007, d'Avila-Levy *et al.*, 2013).

Estudos baseados na deleção génica das classes *TbMSP-A*, *TbMSP-B*, as únicas potencialmente responsáveis pela remoção de VSG, revelam que a gp63 interveniente no processo previamente descrito é resultante da expressão da segunda classe. Embora menos expressiva nas formas tripomastigotas sanguíneas suspeita-se da sua influência na resistência à lise mediada pelo complemento (Gruszyński *et al.*, 2003, LaCount *et al.*, 2003).

Em termos gerais, as metaloprotease de *T. brucei* são responsáveis pela degradação de proteínas constituintes da barreira hemato-encefálica, designadamente o colagénio e laminina, sendo, possivelmente, fulcrais na transição da fase hemolinfática para a meningoencefálica da doença (Bossard *et al.*, 2013).

2. Objetivos

Tendo em conta as considerações anteriores, o presente trabalho teve como objetivo principal a caracterização bioquímica e biológica de metaloproteases de tripanosomatídeos, nomeadamente *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. shawi*, *T. cruzi* e *T. brucei brucei*.

Para a prossecução do objetivo principal do presente estudo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Caracterização do perfil zimográfico das diferentes metaloproteinases expressas em *L. infantum*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. shawi*, *T. cruzi* e *T. brucei brucei*;
2. Determinação da concentração mínima inibitória da atividade de collagenase de metaloproteases de *Leishmania* e *T. cruzi* e *T. brucei brucei*;
3. Quantificação da atividade enzimática de *L. infantum*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. shawi*, *T. cruzi* e *T. b. brucei* na ausência e na presença de inibidor de metaloproteases;
4. Desenvolvimento de um ensaio *in vitro* para a avaliação da interação das metaloproteinases dos diferentes tripanosomatídeos com eritrócitos humanos e com possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento.

3. Materiais e Métodos

3.1. *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* *brucei*

No presente estudo foram utilizadas estirpes de *Leishmania* spp., de *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

Leishmania amazonensis - MHOM/BR/1973/M2269¹

O parasita foi isolado em 1973 de um paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa, no Estado do Pará, no Norte do Brasil. Esta estirpe foi identificada no Instituto Evandro Chagas, em Belém, no Estado do Pará, Brasil com recurso a anticorpos monoclonais e através da análise do perfil enzimático. Formas amastigotas foram mantidas em murquinhos BALB/c através da inoculação do parasita nas patas traseiras e promastigotas foram isolados em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) -1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, *Fetal bovine serum*) (Giorgio *et al.*, 2003, Carvalho *et al.*, 2012)

Leishmania guyanensis - MHOM/BR/2001/M19663¹

O parasita foi isolado, em 2001, de um paciente com leishmaniose cutânea da microrregião de Santarém, na mesorregião do Baixo Amazonas, no Estado de Pará, Brasil. Tecido triturado da lesão, obtido por biópsia, foi inoculado nas patas traseiras de hamsters e isolado em meio Difco B45. No Instituto Evandro Chagas, em Belém, Brasil procedeu-se à sua identificação através da determinação do perfil enzimático e pelo uso de anticorpos monoclonais (Jennings *et al.*, 2014).

Leishmania infantum - MCAN/2012/IHMT0003SG²

O parasita foi obtido por citologia aspirativa com agulha fina do gânglio linfático de um canídeo do canil municipal da região metropolitana de Lisboa, Portugal e mantidas, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) por passagens sucessivas em murquinhos BALB/c. Formas promastigotas foram isoladas em meio Schneider's *Drosophila* (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 10% de FBS.

Leishmania shawi - MHOM/BR/96/M15789¹

O parasita foi isolada em 1973 de um paciente com leishmaniose tegumentária Americana, em Buriticupu, no Estado do Maranhão, no Norte do Brasil. A estirpe foi identificada no Instituto Evandro Chagas, em Belém, no Estado do Pará, Brasil com recurso a anticorpos monoclonais e pela análise do perfil enzimático. Formas amastigotes foram mantidas em murganhos BALB/c através da inoculação dos parasitas nas patas traseiras e promastigotas foram isolados em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de FBS (Passero *et al.*, 2012) a partir dos murganhos infectados.

Estirpe Y de *Trypanosoma cruzi*³

Estirpe isolada de um caso agudo de Doença de Chagas por Silva e Nussenzweig, em 1953. Formas tripomastigotas foram mantidas em murganhos *Swiss* e formas epimastigotas em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*), desenvolvido por Camargo (1964) e modificado por Martinez (2004) (Zingales *et al.*, 2009).

Estirpe Bolívia de *Trypanosoma cruzi*³

Estirpe isolada de fezes de *Triatoma infestans* proveniente de Vitichi, Bolívia, por Funayama e Prado Júnior, 1974. As formas tripomastigotas foram mantidas em murganhos *Swiss* e formas epimastigotas em meio de cultura LIT.

Estirpe QMM5 de *Trypanosoma cruzi*³

Estirpe isolada a partir de formas flageladas do parasita existentes no intestino posterior de triatomíneos (Ribeiro *et al.*, 2014). As formas tripomastigotas foram mantidas em murganhos *Swiss* e formas epimastigotas em meio de cultura LIT (Ribeiro *et al.*, 2014).

Trypanosoma brucei brucei – STIB 247

Estirpe isolada em 1971 de um Búbalu (*Alcelaphus buselaphus*) do Parque Nacional de Serengeti, Tanzania.

¹ Gentilmente cedido pelo Professor Doutor Luís Filipe Passero

² Gentilmente cedido pela Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

³ Gentilmente cedido pelo Professora Doutora Aline Rimoldi Ribeiro Passero

3.2.Cultura axénica dos parasitas

3.2.1. Meios de cultura e sua composição

Os meios de cultura *Schneider's Drosophila* e PIT foram utilizados para o crescimento *in vitro* dos diferentes parasitas e para obtenção dos respectivos extratos proteicos.

Schneider's Drosophila

Meio Schneider's *Drosophila* contendo L-glutamina (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 0,4 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Sigma-Aldrich), 10% de FBS inativado (v/v) (FBS, Sigma-Aldrich), 1,2% (m/v) de cloreto de cálcio (CaCl₂, Sigma-Aldrich), 5mM de HEPES (Sigma-Aldrich) e 0,5% de penicilina/streptomicina (Sigma-Aldrich) (combinação de 10.000 U.ml⁻¹ de penicilina com 10.000 µg.ml⁻¹ de streptomicina) a pH 7,2.

Pancreas Infusion Tryptose (PIT)

O meio PIT resulta da adaptação do meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) desenvolvido por Camargo (1964). O meio PIT é constituído por 68 mM de cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich), 5 mM de cloreto de potássio (KCl, Sigma-Aldrich), 49mM de fosfato de sódio (Na₂HPO₄, Sigma-Aldrich), 11 mM de dextrose (C₆H₁₂O₆, Sigma-Aldrich), 0,5% de triptose (Sigma-Aldrich), 0,3% de caldo LB (LB broth, Sigma-Aldrich) e 0,013% de Haemin (Sigma-Aldrich). À semelhança do meio anteriormente descrito, foi igualmente suplementado com 10% de FBS (v/v) e 0,5% de penicilina/streptomicina e o pH ajustado a 7,2.

3.2.2. Cultura de *Leishmania* spp.

As formas promastigotas virulentas das quatro espécies de *Leishmania* em estudo encontram-se criopreservadas em azoto líquido, nas instalações do IHMT.

O início da cultura foi precedido da descongelação dos criopreservados seguida por centrifugação a 1800 ×g durante 10 min, para separar os parasitas do meio de congelação que é tóxico devido à presença de dimetilsulfóxido (DMSO, *Dimethyl*

sulfoxide). Finda a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os parasitas foram ressuspensos em 1 ml de meio de *Schneider*. Os parasitas foram posteriormente transferidos para um frasco de Roux (*T-flask*) ao qual se acrescentou previamente 1 ml de meio *Schneider* onde foram mantidos a +24°C.

Para a obtenção de *L. infantum* virulenta respeitou-se o limite de cinco passagens sugerido por Santos-Gomes & Abranches (1996).

O volume das culturas foi duplicado, sempre que, após observação no microscópio invertido, se verificava elevada densidade de parasitas.

3.2.3. Cultura de *Trypanosoma cruzi*

A cultura de formas epimastigotas de *T. cruzi* iniciou-se com a transferência de 1 ml de uma cultura já pré-estabelecida para um *T-flask* ao qual se acrescentou previamente 5 ml de meio PIT. A cultura foi mantida a +24°C e o seu volume foi sendo duplicado, sempre que, após observação no microscópio invertido, se verificava elevada densidade de parasitas, até ao volume máximo suportado pelo *T-flask*.

Para a obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi* foi necessário proceder à diferenciação das formas epimastigotas. Foi transferido 1 ml de cultura de epimastigotas já pré-estabelecida para um tubo *Falcon* de 15ml com 9 ml de meio PIT. A cultura foi mantida a +24°C por um período de 25 dias

3.2.4. Cultura de *Trypanosoma brucei brucei*

Um sistema de cultura axénica para *Trypanosoma brucei brucei* foi implementado e otimizado

A primeira fase deste processo consistiu na obtenção de formas sanguíneas do parasita. Murganhos BALB/c foram infetados intraperitonealmente com 500 parasitas. Após o 5º dia de infeção o nível de parasitémia foi diariamente avaliado por microscopia ótica. Por volta do sétimo dia, altura em que presumivelmente se atingiu um pico de parasitémia, foi efetuado o sacrifício dos animais e a colheita de sangue por punção cardíaca.

Para o isolamento do parasita em condições axénicas, 5 µl e 10 µl do sangue colhido foi inoculado em, meio de *Schneider*, RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Alemanha) e

LIT suplementados com 10% e 20% de FBS (v/v). As culturas foram mantidas a +25°C e a +37°C.

Verificou-se que o parasita permaneceu viável somente em meio *Schneider* quando incubado a +24°C, independentemente do inóculo de sangue, contendo o parasita, com que se iniciaram as culturas. Na cultura contendo 20% de FBS observou-se maior densidade parasitária.

Face a este resultado, procedeu-se à cultura axénica de *T. brucei brucei* em meio *Schneider* suplementado com 20% de FBS (v/v). A cultura foi mantida a +24°C e o seu volume foi sendo duplicado, sempre que, após observação no microscópio de fundo invertido, se verificava que se encontrava com elevada carga parasitária, até ao volume máximo suportado pelo *T-flask*.

3.3.Preparação dos extratos

Após atingirem a capacidade volumétrica máxima dos *T-flasks* e se confirmar que se encontravam na fase estacionária de crescimento, as culturas de *Leishmania* e *Trypanosoma* foram centrifugadas 3000 ×g a +4°C, durante 10 min e os sobrenadantes conservados a -20°C, para posterior utilização. Os sedimentos (*pellets*) foram submetidos a 3 lavagens em tampão fosfato salino (PBS), por centrifugação, a 4°C, a 3000 ×g durante 10 min. Findas as lavagens, os parasitas foram ressuspensos em PBS e sujeitos a um processo de lise mecânica que consistiu em seis ciclos de congelação e descongelação a -20°C. Os extratos foram preservados a -20°C até à sua utilização.

Relativamente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* teve-se em consideração que a produção de extrato deveria ocorrer após o 25º dia de cultura.

Para a obtenção dos extratos de *Trypanosoma brucei brucei*, foi necessária a adição de um tampão de lise [120mM de cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich), 50mM de tris-HCL (Trizma, Sigma-Aldrich)] e 0,5% de NP-40 (Biochemika, UE), pH 7,8) durante a primeira lavagem para eliminar os eritrócitos presentes na cultura em consequência do método de isolamento utilizado.

3.4.Determinação da concentração proteica dos extratos

A determinação da concentração de cada extrato foi realizada com recurso ao método de Bradford (1976). Em concordância com o esquema representado na Fig. 11, foi colocada, numa placa de microtitulação (BRANDplates®, BRAND, Alemanha), em triplicado, diluições sucessivas da solução *stock* de 10 mg.ml⁻¹ de BSA (*bovine serum albumina*, Sigma-Aldrich) diluída em PBS, na faixa de 125 a 2000 µg.ml⁻¹ (intervalo de linearidade entre 125 e 1000 µg.ml⁻¹) com o objetivo de estabelecer uma curva padrão. Foi adicionado 250 µl do reagente de Bradford (Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent, Bio-Rad, EUA) mais 5 µl de cada padrão aos respectivos poço. O padrão 0 µg.ml⁻¹, consistindo somente em PBS, corresponde ao branco.

Cada amostra, à semelhança dos padrões, foi testada em triplicado, tendo sido diluída 5 e 10×. 5 µl da amostra diluída foram igualmente adicionados a 250 µl do reagente de Bradford. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foi efetuada a leitura das absovâncias no comprimento de onda de 570 nm. Inferiu-se a concentração de cada extrato recorrendo às densidades óticas (D.O.) da reta de regressão linear.

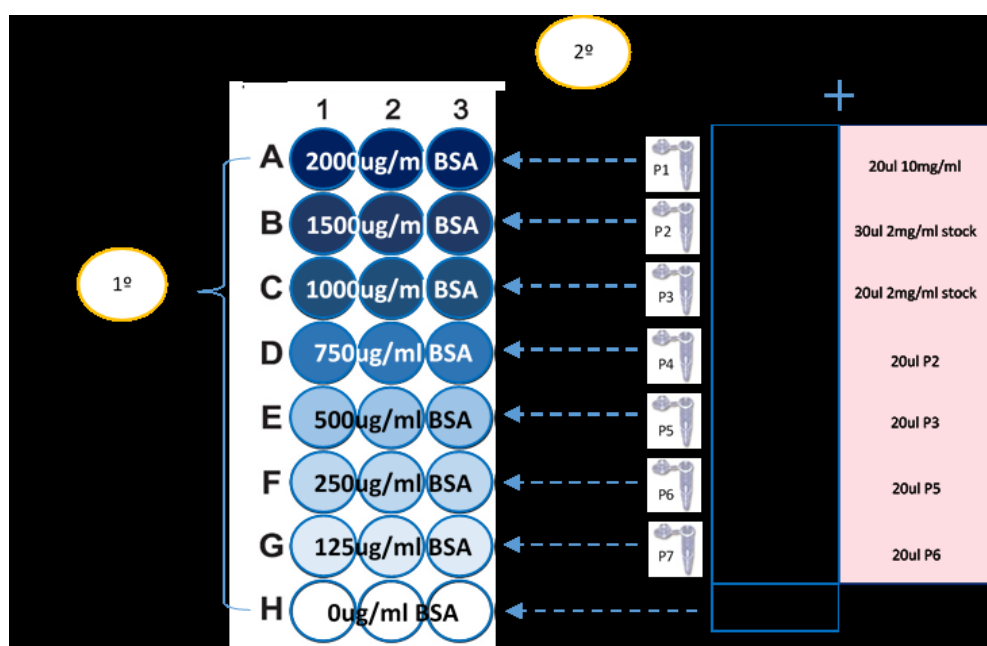


Figura 12: Quantificação de extratos pelo método de Bradford.

3.5. Caracterização bioquímica das metaloproteinases de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*

3.5.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a obtenção do perfil proteico total dos extratos, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%, cuja composição se encontra sumarizada na Fig. 13.

Preparam-se, primeiramente, 8 ml de uma solução, que após polimerização compõe o gel corrida, consistindo em 4,1 ml de água destilada; 3,3 ml de acrilamida (30% acrilamida (m/v) (Sigma-Aldrich) e 0,8% Bis-Acrilamida (v/v) (Sigma-Aldrich); 2,5 ml de 1,5M Tris-HCl (Trizma - Sigma-Aldrich); 100 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS, *Sodium dodecyl sulfate*) (Sigma-Aldrich) a 10% (m/v); 50 µl Persulfato de amônia (Sigma-Aldrich) e 5 µl de tetrametiletenodiamina (TEMED, Sigma-Aldrich). Para o gel de empacotamento foi utilizado 2 ml de gel de uma solução constituída por 2,5 ml água destilada, 450 µL de acrilamida (30% acrilamida (m/v) (Sigma-Aldrich) e 0,8% bis-Acrilamida (v/v) (Sigma-Aldrich); 333 µL de Tris-HCl 0,6M (Trizma - Sigma-Aldrich); 100 µL de SDS (Sigma-Aldrich) a 10% (m/v); 50 µl de solução saturada de persulfato de amônia e 5 µl de TEMED (Sigma-Aldrich).

Gel de corrida			Gel de empacotamento		
10% Acrilamida			4% Acrilamida		
4,1	ml	Água destilada	ml	2,5	
3,3	ml	30% Acrilamida + 0,8% Bis-Acrilamida	ul	450	
2,5	ml	Tris-HCl 1,5M pH 8,8	ul	333	
100	ul	SDS 10%	ul	100	
50	ul	APS (Persulfato de amônia)	ul	50	
5	ul	TEMED	ul	5	

Figura 13: Composição do gel de acrilamida a 10%.

As concentrações dos diferentes extratos foram ajustadas a uma concentração de 1mg.ml⁻¹ e diluídas 1:1 em tampão de amostra para SDS-PAGE para uma concentração final de 500 µg.ml⁻¹. A proporção de 1:1 foi também aplicada para a diluição dos sobrenadantes das culturas no tampão de amostra para SDS-PAGE. Este tampão é

constituído por 3,55 mL de água destilada, 1,25 ml de 0,5M Tris-HCl a pH 6,8, 2,5 ml de glicerol (Sigma-Aldrich), 2 ml de SDS 10% (m/v) (Sigma-Aldrich), 200 µl de azul de bromofenol 0,5% (m/v) (Sigma-Aldrich) e 50 µl de beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

Após diluição, as amostras foram fervidas à temperatura de +100°C durante cinco minutos.

Nos géis, foram aplicados 10 µl de cada extrato, o equivalente a 5 µg. Um dos poços foi reservado para a aplicação de 10 µl de um marcador de massa molecular (*HyperPAGE Prestained Protein Marker*, Bioline, Reino Unido).

Após a aplicação das amostras, os géis foram posteriormente submersos num tampão condutor de corrente, constituído por 25M de Tris, 0,19M de glicina (Sigma-Aldrich) e 0,1% de SDS e submetidos a uma corrente elétrica constante de 100 V, durante aproximadamente 1,5 h, até a frente de corrida se aproximar do seu limite inferior.

De seguida foi efetuada a coloração dos géis com o corante azul de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue R-250*, Bio-Rad, EUA) durante 20 min, após o qual se procedeu à sua descoloração com uma solução composta por 10% de metanol e 5% de ácido acético glacial.

Dada a sua sensibilidade, a coloração por nitrato de prata (*Silver Staining Kit*, Protein, PlusOne™, UE) foi também adotada para a revelação do perfil proteico de cada extrato.

3.5.2. Zimografia

Para avaliação qualitativa da atividade de gelatinase e collagenase de cada extrato foram efetuados ensaios de zimografia. Em géis de poliacrilamida a 10%, preparados conforme descrito no ponto anterior, copolimerizados com 0,41% de gelatina (*gelatin from bovine skin*, Sigma-Aldrich) ou 0,04% de colagénio (*Collagen, Type I solution from rat tail*, Sigma-Aldrich). A atividade de caseínase foi avaliada em géis de caseína adquiridos comercialmente (12% Ready Gel® Zymogram Gel, Bio-Rad).

A concentração de cada extrato foi ajustada a 1 mg.mL⁻¹ e posteriormente diluída, na proporção de 1:1, em tampão de amostra para zimografia, para a obtenção de uma concentração final de 500 µg.mL⁻¹. O referido tampão foi constituído por 62,5mM Tris-HCl, pH 6.8; 5 % (v/v) glicerol; 4 % (p/v) SDS; 0.01 % (p/v) de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich).

Nos géis foi aplicado 5 µg de extrato, equivalente a 10 µl, e foi realizada a separação electroforética a uma voltagem elétrica constante de 80 V, a +4°C durante aproximadamente 3 h e em condições idênticas às aplicadas para a realização do SDS-PAGE.

Concluída a eletroforese, os géis foram submersos em solução renaturante (2,5 % (v/v) Triton X-100) durante 1 h, a +37°C, e em tampão de desenvolvimento (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02 % (p/v) Brij-35) por um período de 16 h a +37°C.

Os géis foram posteriormente corados com azul de Coomassie durante 20 min e descorados com uma solução de 10% de metanol e 5% de ácido acético glacial.

Para a determinação da concentração mínima inibitória de 1,10-fenantrolina (Sigma-Aldrich) necessária para a inibição total da atividade de metaloprotease em substrato de colagénio, foi preparado, por cada extrato, 1 gel, de poço único, de poliacrilamida a 10% co-polimerizado com 0,04% de colagénio.

Após a aplicação do volume de amostra, previamente diluída em tampão de zimografia, necessário para que cada recorte de gel, realizado mais adiante, contivesse 5 µg de proteína, realizou-se a separação electroforética das proteínas, em condições equivalentes às descritas na eletroforese em géis de zimografia. Finda a eletroforese, os géis foram incubados a +37°C em tampão de renaturação durante 1 h e de seguida recortados em tiras.

Cada tira foi incubada numa concentração diferente de 1,10-fenentrolina (Sigma-Aldrich), diluída em 5 ml de tampão de desenvolvimento, durante 16 h à temperatura de +37°C. A concentração do inibidor variou entre os 0 e 2 mM, a primeira equivalente ao controlo positivo do ensaio.

Para a visualização dos resultados procedeu-se à coloração das tiras de gel com azul de Coomassie, seguido de descoloração.

3.6.Determinação da atividade de gelatinase e collagenase por fluorimetria

A quantificação relativa da atividade de gelatinase e collagenase dos diferentes extratos foi realizada com recurso a ensaios de fluorimetria (*EnzCheck Gelatinase/Collagenase Assay Kit*®, Lifetechnologies, EUA).

Para a determinação da atividade lítica da gelatina dos extratos parasitários, nos poços de uma placa de microtitulação (BRANDplates®, BRAND, Alemanha) foi adicionado, 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de cada extrato e 12,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de gelatina conjugada com fluoresceína, diluídos em tampão de reação, num volume final de 200 μl . A placa foi de seguida incubada durante +24 h à temperatura ambiente. As leituras da fluorescência foram realizadas a num comprimento de onda de absorção e emissão de 485 nm e 535 nm respetivamente. A atividade proteolítica é proporcional ao aumento da fluorescência pois da primeira resulta a degradação do substrato e consequente libertação de fluoresceína.

A determinação da atividade de collagenase dos extratos foi determinada por processo similar. O único elemento divergente, comparativamente ao protocolo anterior, foi o substrato que nesta situação consistiu em colagénio conjugado com fluoresceína.

Para os ensaios anteriormente descritos, a par dos extratos, foram igualmente utilizados um controlo positivo e um branco. Relativamente ao primeiro testaram-se 0,05 U. ml^{-1} de uma enzima fornecida pelo *Kit* com atividade de collagenase; o branco consistiu meramente em 12,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de substrato diluído em tampão de reação. Todas as amostras, brancos e controlos foram testados em triplicado.

Terminada esta primeira fase, realizaram-se de seguida novos ensaios, em condições idênticas às anteriormente descritas, nos quais se testou o efeito da 1,10-fenantrolina na atividade das metaloproteases de cada extrato. A cada reação foi adicionado 0,1 mM deste inibidor.

3.6.1. Tratamento estatístico dos dados

O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para comprovar estatisticamente a inibição de metaloproteases na presença da 1,10-fenantrolina. Foi igualmente necessário para a comparação dos níveis de expressão enzimática dos diferentes extratos. O teste não paramétrico de Wilcoxon foi utilizado para averiguar a

ocorrência de diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de atividade enzimática registrados no início e no final dos períodos de incubação. A análise estatística e os gráficos foram efetuados no Graphpad Prism 6.0 (EUA).

3.7.Ensaio biológicos em eritrócitos humanos

3.7.1. Preparação de soluções

Solução de Alsever

Diluíram-se 4,2 g de cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich), 20,5 g D-glucose, 8g de citrato de sódio e 0,55 g de ácido cítrico em 100 ml de água destilada e o pH final ajustado a 7,3-7,5.

Veronal Buffer solution (VBS⁺⁺)

Diluíram-se 0,15 mM de cloreto de cálcio (CaCl₂, Sigma-Aldrich), 0,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂, Sigma-Aldrich), 141 mM cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich), 4 mM ácido barbitúrico (Merck, Alemanha) e 0,1% Gelatina (Gelatin from bovine skin, Sigma-Aldrich) em 1 l de água destilada e o pH final da solução ajustado a 7,3-7,5.

VBS⁺⁺ + 10mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

Diluíram-se 141 mM cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich), 4 mM de ácido barbitúrico, 0,1% Gelatina (Gelatin from bovine skin, Sigma-Aldrich) e 10 mM de EDTA (EDTA, Sigma-Aldrich) em 1 l de água destilada e o pH final da solução ajustado a 7,3-7,5.

Tampão de lise

Diluíram-se 120 mM de cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich), 50 mM de tris-HCL (Trizma, Sigma-Aldrich) e 0,5% de NP-40 (Biochemika, UE), pH 7,8, em 100 ml de água destilada.

3.7.2. Obtenção de eritrócitos e soro humanos

Eritrócitos (Eh) e soro (SHN) humanos foram obtidos de indivíduos saudáveis.

Do total de sangue total colhido, por indivíduo, 5 ml foram, de imediato, diluídos em 5 ml de solução anticoagulante Alsever, para a obtenção de eritrócitos. O restante foi incubado a +37°C durante 30 min, e de seguida a +4°C, durante 30 min. Findos os períodos de incubação, que visaram a retração do coágulo, o tubo contendo o sangue foi centrifugado a 3000 ×g durante 10 min para a obtenção de soro humano. O volume total de soro obtido foi aliquoteado em *ependorffs* e conservado a -20°C até à sua utilização. Para a inativação do sistema complemento procedeu-se, após descongelação do soro, à sua incubação a uma temperatura de 56°C durante 60 min.

Para a obtenção de um concentrado de Eh, a solução de Alsever contendo eritrócitos humanos foi incubada a +4°C durante 8 h. A conservação dos eritrócitos a +4°C não excedeu o período máximo de uma semana.

Para a realização dos ensaios de sensibilização dos eritrócitos pelos extratos proteicos totais de cada parasita foi utilizada uma solução de eritrócitos humanos a 2% (Eh 2%). A sua preparação consistiu na diluição de 1 ml do concentrado de Eh em 49 ml de VBS⁺⁺ ou VBS⁺⁺+EDTA seguida de três lavagens, a 300 ×g durante 5 min, no diluente respetivo, de modo a eliminar vestígios de hemólise.

Em cada ensaio foi imperativa a utilização de soro e eritrócitos humanos provenientes do mesmo indivíduo.

3.7.3. Sensibilização dos eritrócitos humanos com extratos de *Leishmania* e *Trypanosoma*

Em frascos de vidro passíveis de serem centrifugados foram adicionados 1,5 ml de extrato diluído em VBS⁺⁺, numa concentração final de 200 ou 100 µg.ml⁻¹ e 1,5 ml de Eh 2% diluído em VBS⁺⁺. Cada frasco foi, de seguida, incubado durante 1 h a 37°C e posteriormente centrifugado a 3000 ×g durante 5 min. Após a última lavagem, o *pellet* foi ressuspenso em 1,5 ml de VBS⁺⁺ de modo a manter a concentração original de 2% de eritrócitos humanos (Fig. 14). 150 µl do sobrenadante de cada frasco foi posteriormente transferido para uma placa de microtitulação e a leitura das densidade

óticas (D.O.) de cada sobrenadante efetuada a um comprimento de onda de 415 nm sendo diretamente proporcional ao nível de hemólise ocorrida.

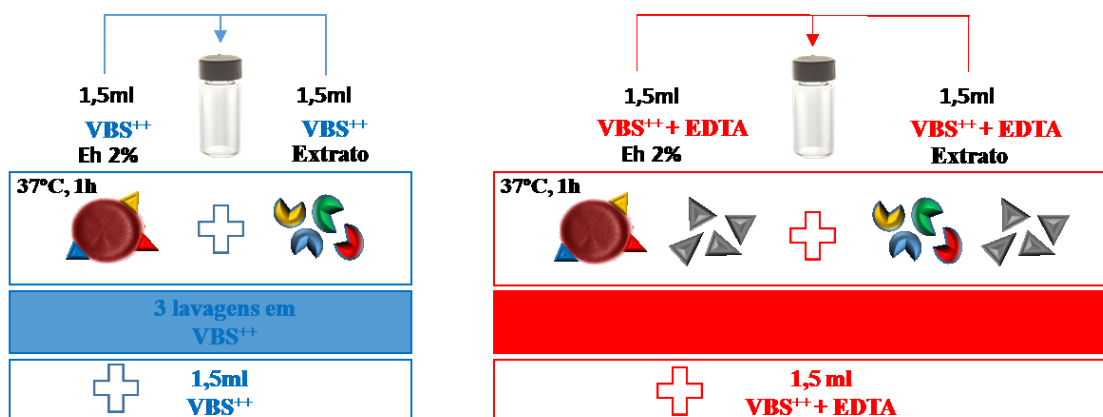


Figura 14: Procedimento do ensaio de sensibilização de Eh com extratos de *Leishmania* e *Trypanosoma*

Para confirmar, ou refutar, o contributo das metaloproteases na sensibilização do Eh, a experiência foi reproduzida na presença de um inibidor enzimático de metaloproteases, EDTA. Os extratos e os eritrócitos foram diluídos em VBS⁺⁺+EDTA e as lavagens realizadas com VBS⁺⁺+EDTA.

Todos os ensaios de sensibilização de Eh foram acompanhados de um controlo negativo que consistiu em 1,5 ml de 2% de Eh diluídos em VBS⁺⁺ mais 1,5 ml de VBS⁺⁺ ou 1,5 ml de 2% de Eh diluídos em VBS⁺⁺ + EDTA mais 1,5 ml de VBS⁺⁺ + EDTA.

3.7.4. Estudo do efeito do complemento nos eritrócitos sensibilizados

O efeito do complemento nos eritrócitos sensibilizados pelos extratos de *Leishmania* e *Trypanosoma* foi analisado.

Os Eh sensibilizados pelos extratos parasitários, na ausência e na presença de inibidor da atividade de metaloproteases, foram incubados com 50% e 25% de soro com o sistema complemento ativado e inativado (Fig. 15). Nos eritrócitos sensibilizados na presença de EDTA foi ainda estudado o efeito do complemento na ausência e presença deste inibidor de metaloproteases e do sistema complemento

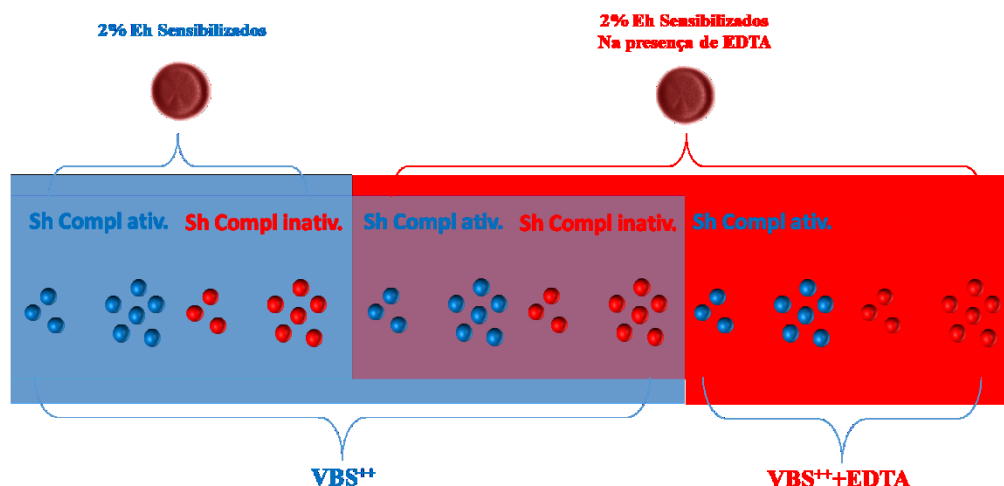


Figura 15: Estudo do efeito do complemento nos eritrócitos sensibilizados

Cada solução de 2% de Eh sensibilizados foi testada em duplicado numa placa de microtitulação com fundo cônico.

Para a avaliação do efeito de 50% e 25% de Sh nos eritrócitos previamente sensibilizados, foi adicionado, respetivamente, 50 e 75 µl de VBS⁺⁺ contendo ou não inibidor, seguido da adição de 50 e 25 µl de soro. O volume total de reação foi completado com 100 µl de 2% Eh sensibilizados. Como controlo positivo foram adicionados 100 µl de tampão de lise e 100 µl de Eh sensibilizados. O controlo negativo foi constituído por 100 µl de VBS⁺⁺ ou VBS⁺⁺ + EDTA e 100 µl da solução de Eh sensibilizados. Os brancos relativos às amostras contendo 50% e 25% de soro foram constituídos por 150 e 175 µl, respetivamente, de VBS⁺⁺ com ou sem inibidor e 50 ou 25 µl do soro testado, respetivamente. Para o branco relativo ao controlo negativo foi usado 200 µl de VBS⁺⁺ com ou sem EDTA, e o branco do controlo positivo foi preparado com 100 µl de tampão de lise mais 100 µl de VBS⁺⁺ com ou sem EDTA.

Após a preparação das reações, as placas foram incubas a +37°C durante 1 h. Terminada a incubação foram centrifugadas a 3000×g durante 5 min. Para uma placa de microtitulação (BRANDplates®, BRAND, Alemanha) foi transferido 150 µl de cada sobrenadante. A leitura da D.O. foi efetuada no comprimento de onda de 415 nm.

Os ensaios de sensibilização dos eritrócitos humanos com extratos de *Leishmania* e *Trypanosoma* e de avaliação do efeito do complemento nos eritrócitos sensibilizados foram realizados duas vezes a fim de eferir a reprodutibilidade dos resultados.

4. Resultados e Discussão

4.1. Perfil proteico total de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*

Leishmania, *T. cruzi* e *T. brucei brucei* são protozoários que integram a mesma família taxonómica sendo por isso expectável que apresentem proteínas em comum.

Os perfis dos extratos dos diferentes parasitas foram analisados em géis de poliacrilamida corados com azul de *Coomassie* (Fig. 16a) e com nitrato de prata (Fig. 16b). Embora a coloração por nitrato de prata seja reconhecida pela sua elevada sensibilidade, que possibilita a deteção de ng de proteína, esta sua qualidade reflete-se na necessidade de maior controlo do tempo de coloração pois se excessivo resulta na obtenção de bandas de proteínas indistinguíveis equiparáveis a “manchas” (Chevallet *et al.*, 2006).

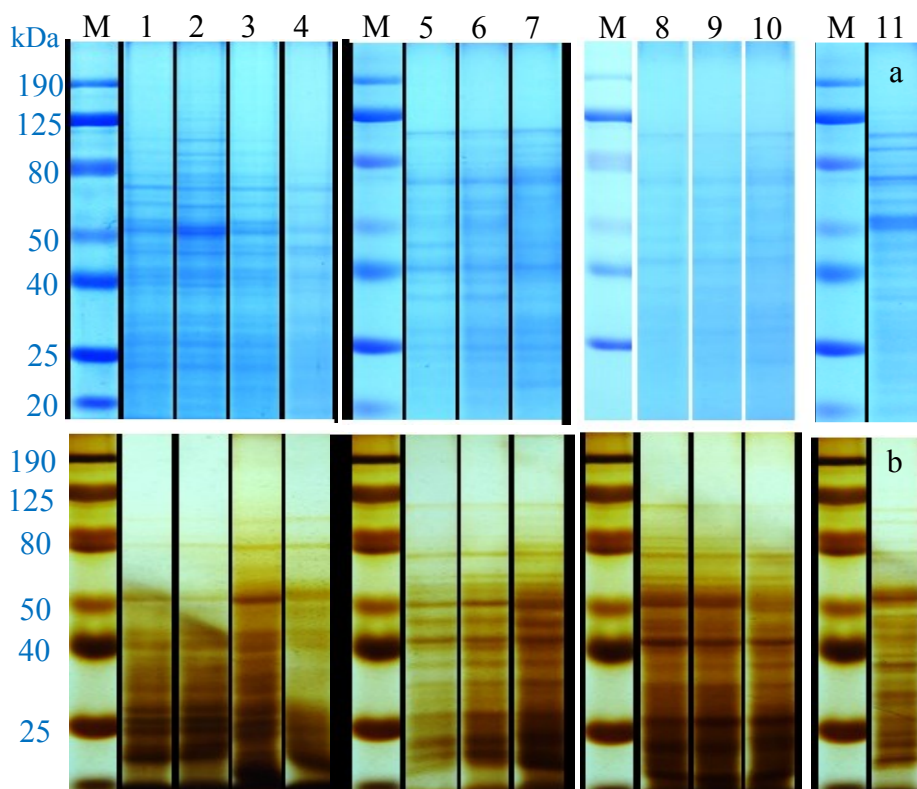


Figura 16: Perfil proteico total dos extratos de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei* em géis corados com azul de *Coomassie* (a) e nitrato de prata (b). M – Marcador de pesos moleculares; 1 – *L. amazonensis*; 2 – *L. guyanensis*; 3 – *L. infantum*; 4 – *L. shawi*; 5 – *T. cruzi* Y, epi.; 6 – *T. cruzi* Bol. epi.; 7 – *T. cruzi* QMM5, epi.; 8 – *T. cruzi* Y, trip.; 9 – *T. cruzi* Bol. trip., 10 – *T. cruzi* QMM5, trip. e 11 – *T. b. brucei*.

Embora redundantes na informação que facultam, a apresentação de géis corados por diferentes técnicas permitiu a existência de uma alternativa quando num deles o perfil de proteínas se revelou menos perceptível. Nos extratos de *Leishmania* observou-se um maior número de bandas individualizadas no primeiro gel corado por azul Coomassie o que proporciona uma avaliação mais detalhada deste perfil. Em *Trypanosoma cruzi* obteve-se um perfil mais nítido e detalhado no gel corado por nitrato de prata. Relativamente ao *T. brucei brucei*, as proteínas com peso molecular superior a 50 kDa encontram-se melhor diferenciadas no primeiro gel contrariamente às proteínas de menor peso molecular que se distinguem melhor no segundo.

No gel corado por nitrato de prata constata-se a existência de proteínas de peso molecular próximo dos 80 kDa que são aparentemente partilhadas pelos três parasitas. A proteína de peso molecular ligeiramente superior a 50 kDa, transversal a todos os perfis, é, por comparação com os resultados patentes na Fig. 17, proveniente do FBS usado para suplementar as culturas. A albumina, o principal constituinte deste suplemento é uma proteína de 66,5 kDa, peso este compatível com a justificação apresentada.

A observação do sobrenadante das culturas dos parasitas (Fig. 17) permite inferir, por comparação com os controlos negativos, C1 e C2, correspondentes, respetivamente, a meio LIT e meio *Schneider*, que não houve excreção detetável de proteínas para o meio de cultura.

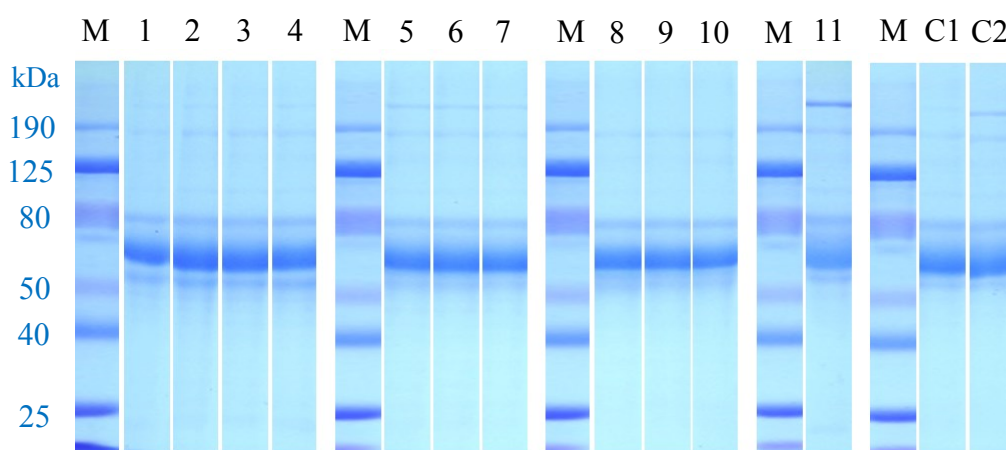


Figura 17: Perfil proteico total dos sobrenadantes das extratos de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*. M – Marcador de pesos moleculares; 1 – *L. amazonensis*; 2 – *L. guyanensis*; 3 – *L. infantum*; 4 – *L. shawi*; 5 – *T. cruzi* Y, epi.; 6 – *T. cruzi* Bol. epi.; 7 – *T. cruzi* QMM5, epi.; 8 – *T. cruzi* Y, trip.; 9 – *T. cruzi* Bol. trip., 10 – *T. cruzi* QMM5, trip.; 11 – *T. b. brucei*; C1 – meio LIT e C2 – meio *Schneider*.

Embora os perfis dos três parasitas sejam claramente distintos entre si é também evidente que não é possível distinguir entre as diferentes espécies de *Leishmania* e estirpes de *T. cruzi*. Em relação às formas epimastigotas e tripomastigotas deste último parasita não se detetaram, igualmente, variações importantes nos perfis proteicos.

A gp63 é uma metaloprotease altamente expressa em *Leishmania spp.* e produzida em menor quantidade em *T. cruzi*. A existência de maior número de proteínas entre os 50 e os 80 kDa em todos os perfis de *Leishmania* poderá dever-se à presença de um maior número de moléculas de gp63 que poderá exibir diferentes pesos moleculares, próximos de 63 kDa, consoante o seu estado de glicosilação.

4.2. Atividade enzimática em géis de colagénio, gelatina e caseína

A comparação qualitativa da expressão de metaloproteases dos diferentes tripanosomatídeos foi estabelecida com base nos perfis enzimáticos em géis de colagénio, gelatina e caseína.

Embora os substratos se encontrassem incorporados nos géis em diferentes concentrações constatou-se que a maior ou menor atividade dos extratos esteve relacionada com a natureza do substrato e a afinidade das enzimas para cada substrato, e não com o seu modo de preparação. Os zimogramas de colagénio são considerados altamente sensíveis estando descrita a sua capacidade de deteção de 0,1 pg de MMP-1 ativa. Por sua vez, a zimografia em géis de gelatina, embora menos sensível, permite a deteção de 10 pg de MMP-2. A zimografia em caseína é considerada a menos sensível deste grupo de substratos (Beurden & Hoff, 2005). Por esse motivo, e apesar de neste estudo não ser viável a deteção de níveis residuais de enzimas, dado os 5 µg de proteína aplicados no gel provirem de extrato proteico total de parasita e não de uma enzima purificada, a atividade de metaloproteases em géis compostos por 0,04% de colagénio foi superior à verificada em géis de gelatina contendo 0,41% de gelatina. Nas figuras 18, 19 e 20 encontram-se representadas as atividades dos diferentes extratos na presença de colagénio, gelatina e caseína, respetivamente. A inesperada superior atividade enzimática dos extratos em gel de caseína comparativamente ao de gelatina deveu-se, provavelmente, ao facto de a primeira ser de origem comercial pelo que se encontra melhor otimizada para a revelação de atividade enzimática comparativamente ao gel de gelatina *in house*.

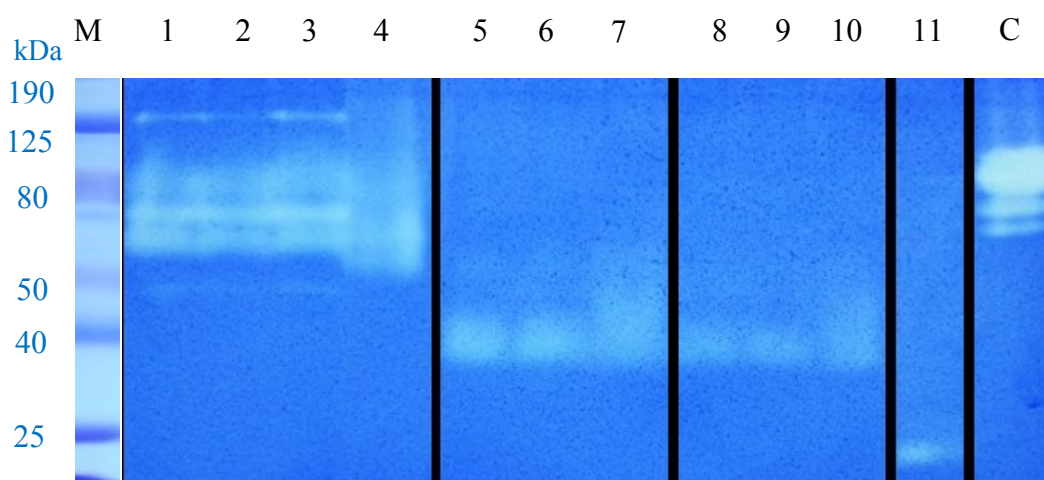


Figura 18: Perfil enzimático, em colagénio, de extratos de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*. M – Marcador de pesos moleculares; 1 – *L. amazonensis*; 2 – *L. guyanensis*; 3 – *L. infantum*; 4 – *L. shawi*; 5 – *T. cruzi* Y, epi.; 6 – *T. cruzi* Bol. epi.; 7 – *T. cruzi* QMM5, epi.; 8 – *T. cruzi* Y, trip.; 9 – *T. cruzi* Bol. trip., 10 – *T. cruzi* QMM5, trip. e 11 – *T. b. brucei* e C- controlo positivo (colagenase).

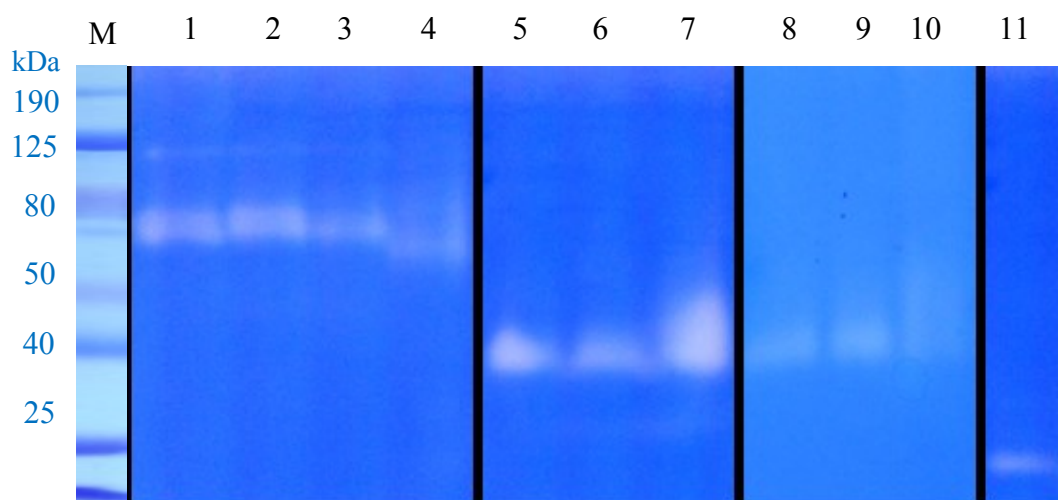


Figura 19: Perfil enzimático, em gel de gelatina, de extratos de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*. M – Marcador de pesos moleculares; 1 – *L. amazonensis*; 2 – *L. guyanensis*; 3 – *L. infantum*; 4 – *L. shawi*; 5 – *T. cruzi* Y, epi.; 6 – *T. cruzi* Bol. epi.; 7 – *T. cruzi* QMM5, epi.; 8 – *T. cruzi* Y, trip.; 9 – *T. cruzi* Bol. trip., 10 – *T. cruzi* QMM5, trip. e 11 – *T. b. brucei*.

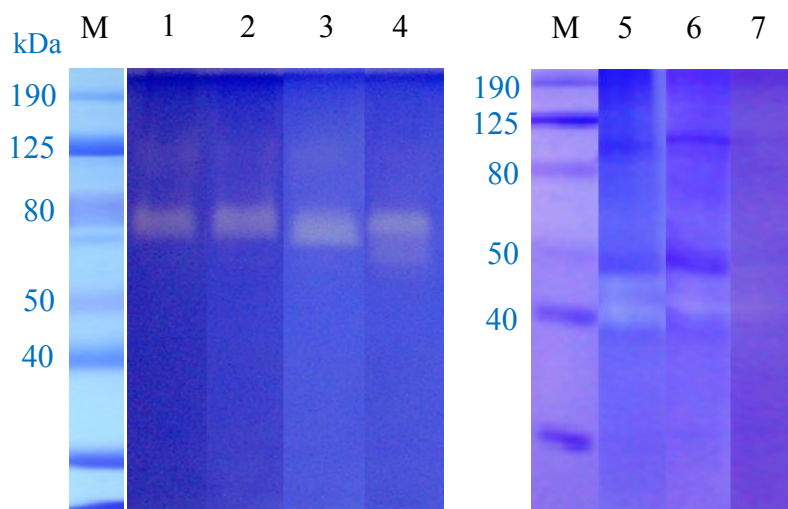


Figura 20: Perfil enzimático, em caseína, de extratos de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*. M – marcador de pesos moleculares; 1 – *L. amazonensis*; 2 – *L. guyanensis*; 3 – *L. infantum*; 4 – *L. shawi*; 5 – *T. cruzi* Y, epi.; 6 – *T. cruzi* Bol. epi. e 7 – *T. cruzi* QMM5, epi..

Não se encontraram diferenças no perfil de expressão dos extratos proteicos em função do substrato; porém, há claras diferenças quando comparados os perfis de atividade enzimática de *Leishmania* spp., *T. cruzi* e *T. b. brucei*.

As quatro espécies de *Leishmania* apresentaram atividade proteolítica mediada por uma enzima de peso molecular situado entre os 50 kDa e 80 kDa. Sendo a gp63 a principal proteína de superfície destes parasitas, é altamente provável que a enzima em questão corresponda à MSP. Para a confirmação da sua presença seria recomendada a sequenciação dos aminoácidos que compõem as proteínas presentes nos géis por espectrometria de massa. Assumindo que a enzima presente nos géis é efetivamente a gp63, constatou-se que o extrato de *L. shawi* exibe menor peso molecular possivelmente derivado de um diferente estado de glicosilação. A banda de aproximadamente 120 kDa expressa por todas as espécies de *Leishmania* poderá corresponder à forma inativada da gp63 que, por ainda deter o pró-péptido, apresentou maior peso molecular comparativamente à forma ativa da enzima.

No que concerne a atividade enzimática de extratos de *T. cruzi*, conclui-se que não há diferenças na expressão enzimática em função da forma morfológica do parasita. Em ambos os estadios do parasita assistiu-se à produção de uma enzima de aproximadamente 40 kDa.

A atividade proteolítica de *T. b. brucei* em géis de colagénio e gelatina deveu-se à existência de uma proteína de reduzido peso molecular inferior a 25 kDa. O presente

resultado é discordante dos resultados apresentados por Sousa *et al.* (2010) que em ensaios similares detetaram a presença de uma única enzima de 40 kDa com atividade gelatinolítica e caseínolítica.

4.3. Concentração mínima inibitória de metaloproteases em géis de colagénio

Embora nos géis de zimografia tenham sido fornecidas as condições ideais para o ótima atividade de metaloproteases, a sua efetiva presença carece de testes confirmatórios, pois enzimas hidrolíticas de centro ativo distinto poderão igualmente exercer atividade proteolítica em condições análogas às aplicadas neste estudo. Nesse sentido, pretendeu-se confirmar a presença de metaloproteases mediante a observação da sua inibição quando na presença de um inibidor específico de metaloproteases, a 1,10-fenantrolina.

Os ensaios realizados permitiram estimar a concentração mínima inibitória da atividade de metaloproteases dos extratos uma vez que se testaram concentrações crescentes de inibidor num intervalo que variou entre os 0 e 0,02 mM para *Leishmania* e os 0 e 0,04 mM para formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Verificou-se, a inibição total do controlo positivo (Fig. 21), uma collagenase de *Clostridium hystoliticum* com atividade dependente de Zn^{+} e de peso molecular variável entre os 68 e 125 kDa, com 0,05 mM de 1,10-fenantrolina (Chang *et al.*, 1999, Junge *et al.*, 1999). Deste modo garantiu-se a validade dos resultados obtidos.

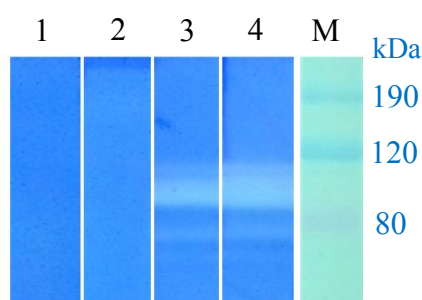


Figura 21: Inibição de collagenase de *Clostridium hystoliticum*, em colagénio, com diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina. 1 – 0,01 mM; 2 – 0,005 mM; 3 – 0,0025 mM; 4 – 0,00125 mM; 5 – 0 mM e M - marcador de pesos moleculares.

A maior concentração de inibidor testada em ambos os ensaios não inibiu totalmente a atividade enzimática dos extratos de *Leishmania* spp. e de *T. cruzi* testados (Fig. 22 e 23).

Relativamente aos parasitas de género *Leishmania*, as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* foram as mais suscetíveis à inibição pela 1,10-fenantrolina.

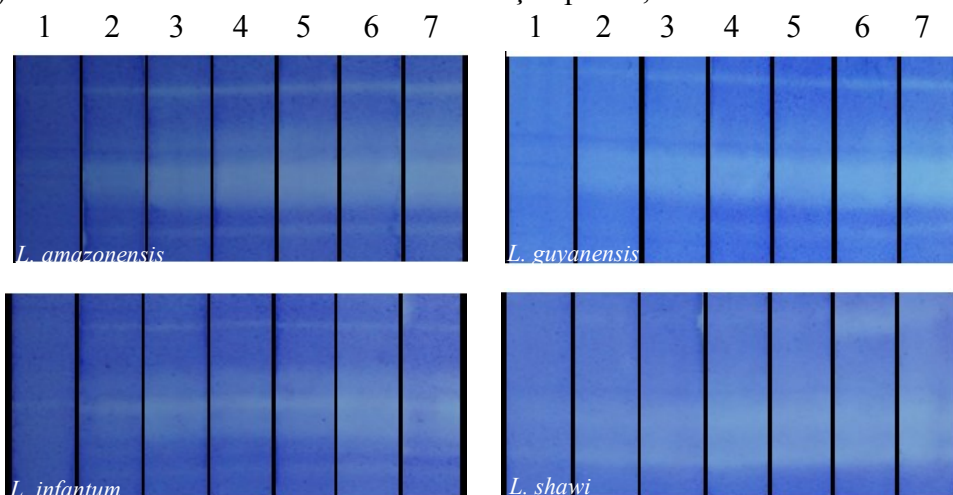


Figura 22: Inibição de metaloproteases, em colagénio, de extratos de *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum* e *L. shawi* com diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina. 1 – 0,02 mM; 2 – 0,01 mM; 3 – 0,005 mM; 4 – 0,0025 mM; 5 – 0,00125 mM; 6 – 0,000625 mM e 7 – 0 mM.

Em *T. cruzi*, somente uma estirpe foi totalmente inibida. Determinou-se que a concentração mínima inibitória (CMI) de *T. cruzi* Bolívia é de 0,5 mM de 1,10-fenentrolina.

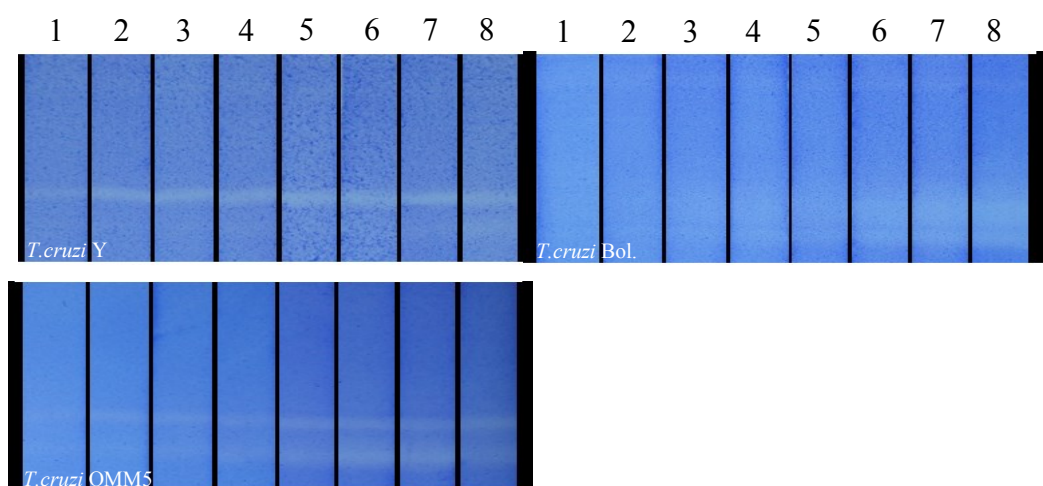


Figura 23: Inibição de metaloproteases, em colagénio, de extratos de formas epimastigotas de *T. cruzi* Y, *T. cruzi* Bol. e *T. cruzi* QMM5 com diferentes concentrações de 1,10-fenantrolina. 1 – 0,04 mM; 2 – 0,02 mM; 3 – 0,01 mM; 4 – 0,005 mM; 5 – 0,0025 mM; 6 – 0,00125 mM; 7 – 0,000625 mM e 8 – 0 mM.

4.4. Determinação da atividade de gelatinase e collagenase por ensaios de fluorimetria

4.4.1. Atividade enzimática de gelatinase

Comparativamente à atividade dos extratos de *Leishmania* spp., de formas epimastigotas (epi.) e tripomastigotas (tripo.) de *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei* analisados, a atividade gelatinolítica do controlo positivo (0,05 U.mL⁻¹) foi sempre elevada ao longo das 28 h, estando bastante aumentada após 15 h de incubação à temperatura ambiente (T.A.). A diferença entre a atividade registada às 0 e às 28 h foi estatisticamente significativa ($p = 0,0011$).

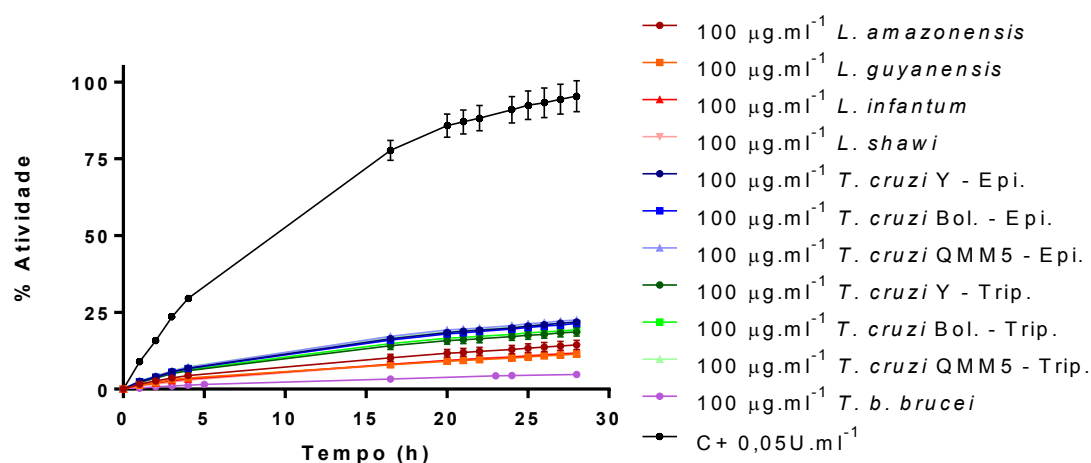


Figura 24: Atividade gelatinolítica do controlo positivo comparativamente à dos extratos de *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. b. brucei* ao longo de 28 h, à T.A.

A comparação da atividade gelatinolítica dos diferentes extratos parasitários (Fig. 25) permitiu verificar que os extratos das formas epimastigotas de *T. cruzi* exibiram maior atividade enzimática em gelatina. Os extratos de ambas as formas morfológicas de *T. cruzi* apresentaram atividade enzimática superior aos extratos de *Leishmania* e de *T. b. brucei*. Este último extrato foi o que apresentou menor atividade enzimática.

A atividade enzimática dos extratos de *Leishmania* foi inferior e apresentou diferenças estatisticamente significativas, relativamente à atividade de gelatinase de *T. cruzi* (valores de $p < 0,0001$). Comparativamente aos extratos de *T. b. brucei*, a atividade gelatinolítica dos extratos de *Leishmania* foi igualmente significativamente elevada ($p < 0,0001$).

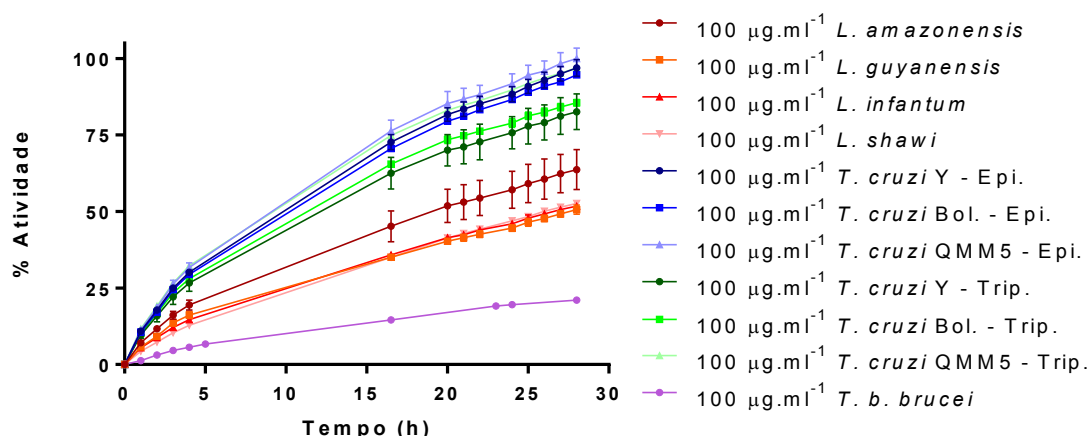


Figura 25: Atividade gelatinolítica dos extratos de *Leishmania* spp., *T. cruzi* e *T. b. brucei* ao longo de 28 h, à T.A.

As acentuadas diferenças encontradas ao nível de atividade enzimática dos diferentes extratos correlacionam-se com o diferente perfil de expressão enzimático associado a cada parasita.

Dado que a atividade de gelatinase observada é resultado de um conjunto de enzimas gelatinolíticas presentes nos extratos, foi necessário proceder à inibição específica de metaloproteases por forma a aferir o seu efetivo contributo para este tipo de atividade. Quanto mais representativa for a sua presença na atividade enzimática total dos extratos, maior será a redução desta atividade quando na presença do inibidor.

Para aferir a concentração ideal de 1,10-fenantrolina a testar nos ensaios de inibição, determinou-se qual a concentração capaz de inibir por completo a atividade enzimática do controlo positivo. A sua eficaz inibição foi conseguida mediante incubação, durante 28 h à T.A., com 0,1 mM de 1,10-fenantrolina. Este resultado motivou a escolha desta concentração para a avaliação da inibição total de metaloproteases nos estudos subsequentes

Na figura 26 encontra-se uma representação gráfica da razão entre os valores de atividade normal do controlo positivo e os valores da sua atividade sob o efeito da 1,10-fenantrolina. Às 0 h a atividade do referido controlo incubado com inibidor já só equivalia a 67% da atividade normal da enzima; às 28 h esta razão decresceu para 11,5%.

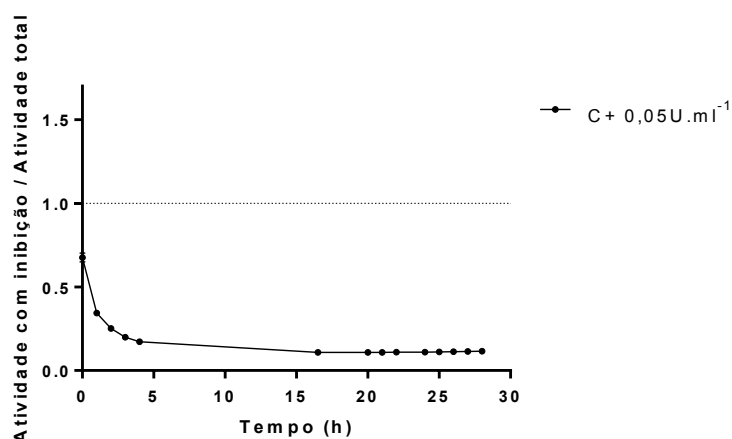


Figura 26: Efeito inibitório da atividade gelatinolítica do controle positivo, pela 1,10-fenentrolina, ao longo de 28 h, à T.A.

Nos extratos de *Leishmania* spp. a redução da atividade enzimática por inibição da atividade total de metaloproteases (Fig. 27) foi estatisticamente significativa comparativamente à atividade não inibida. Observou-se que a inibição ocorrida em *L. amazonensis* ($p=0,0054$), *L. guyanensis* ($p=0,0054$) e *L. infantum* ($p=0,0080$) foi superior à verificada em *L. shawi* ($p=0,0255$). Nas 3 primeiras espécies, a contribuição das metaloproteases para a capacidade gelatinolítica total foi de 49%, 45% e 37%, respectivamente enquanto que em *L. shawi* este valor foi de apenas 22%.

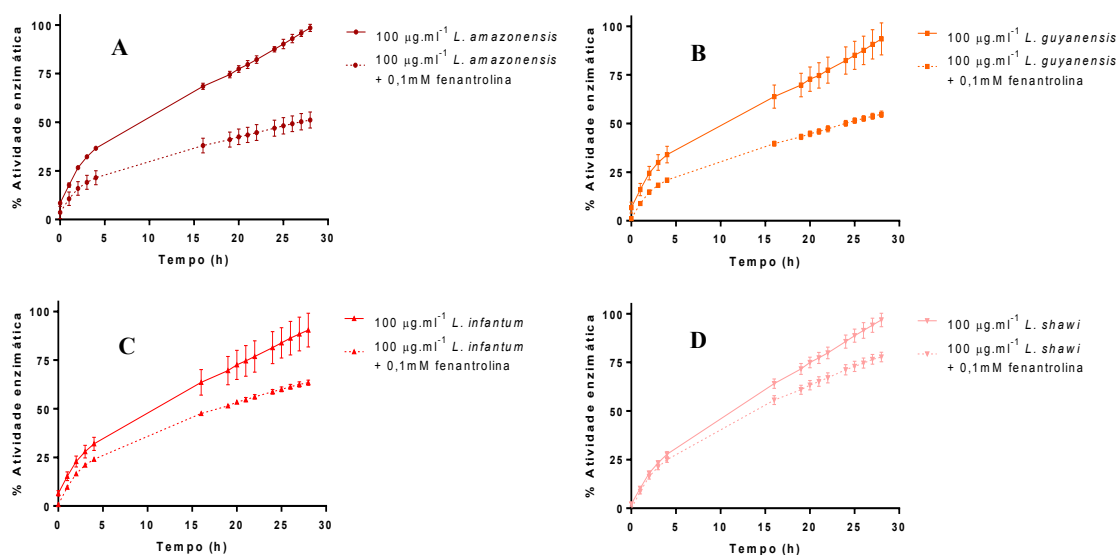


Figura 27: Atividade gelatinolítica dos extratos de *Leishmania* spp. na presença e na ausência de 1,10-fenentrolina, ao longo de 28 h à T.A. A – *L. amazonensis*; B – *L. guyanensis*; C – *L. infantum* e D – *L. shawi*.

Estes resultados, em conjunto com o dos perfis enzimáticos obtidos nos ensaios de zimografia, permitem concluir que *L. Shawi* apresenta, relativamente às restantes espécies de *Leishmania* avaliadas, um perfil de atividade de metaloproteases distinto (Fig. 27D).

Relativamente aos extratos de formas epimastigotas de *T. cruzi* a diferença de atividade que se verificou, (Fig. 28) decorrente da presença de inibidor, foi estatisticamente significativa tendo, embora, sido menos evidente na estirpe Y ($p = 0,0305$) do que nas estirpes Bol. ($p = 0,0117$) e QMM5 ($p = 0,0105$). Perante os resultados obtidos, assume-se que nestas duas últimas estirpes, a presença de metaloproteases contribui, respetivamente, para 56 % e 53% do total de atividade de collagenase. Na estirpe Y este valor decresce para 31%.

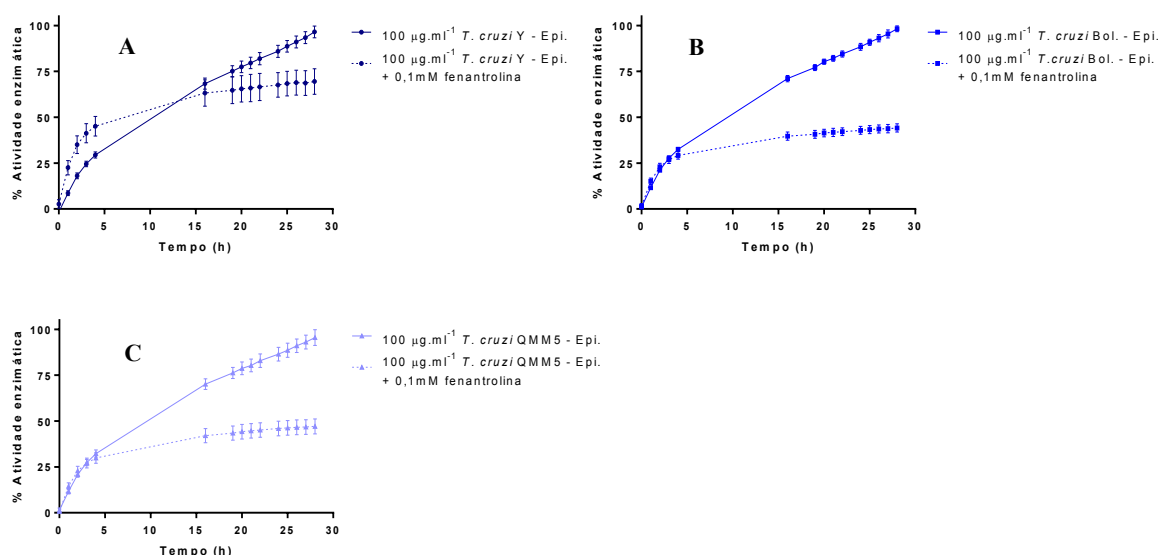


Figura 28: Atividade gelatinolítica dos extratos de epimastigotas de *T. cruzi* na presença e na ausência de 1,10-fenantroline, ao longo de 28 h à T.A. A – *T. cruzi* Y; B – *T. cruzi* Bol. e C – *T. cruzi* QMM5.

À semelhança do ocorrido nos extratos das formas epimastigotas, o decréscimo de atividade foi menos representativo na estirpe Y ($p = 0,0193$) comparativamente às estirpes Bol. ($p = 0,0129$) e QMM5 ($p = 0,0094$). Nestes extratos, as metaloproteases contribuírem em 37%, 49% e 51% para o total de atividade de collagenase.

Mediante a comparação destes com os resultados de atividade enzimática dos extratos de formas epimastigotas, infere-se que o perfil de atividade de metaloproteases, em gelatina, de *T. cruzi* não varia consoante a forma morfológica do parasita mas difere entre as diferentes estirpes

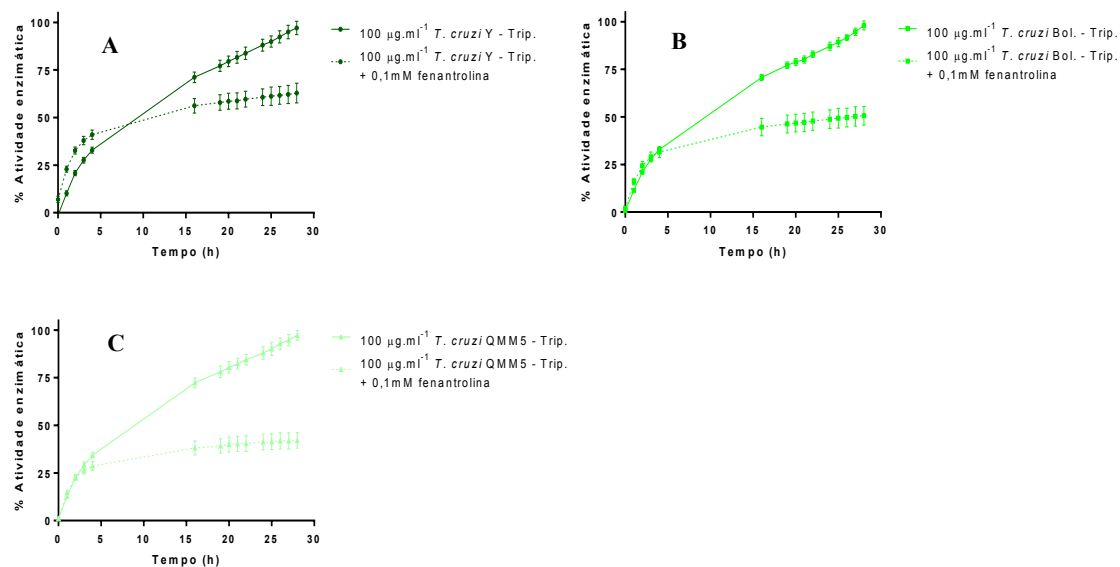


Figura 29: Atividade gelatinolítica dos extratos de de tripomastigotas de *T. cruzi* na presença e na ausência de 1,10-fenanthrolina, ao longo de 28 h à T.A. A – *T. cruzi* Y; B – *T. cruzi* Bol. e C – *T. cruzi* QMM5.

Em *T. b. brucei*, e contrariamente ao que se verificou com os restantes extratos, embora se tenha assistido a um decréscimo da atividade enzimática de 35% (Fig. 30), esta diferença não se revelou estatisticamente significativa pelo que não pode ser atribuída ao efeito inibitório da 1,10-fenanthrolina.

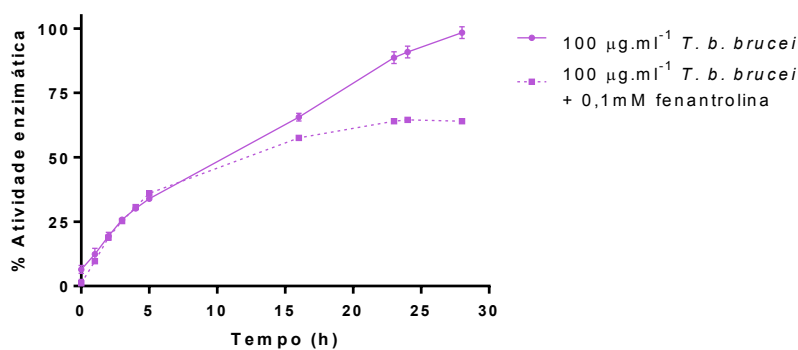


Figura 30: Atividade gelatinolítica do extrato de *Trypanosoma brucei brucei* na presença e na ausência de 1,10-fenanthrolina, ao longo de 28 h à T.A.

4.4.1. Atividade enzimática de collagenase

Para a validação dos ensaios enzimáticos em colagénio, a atividade do controlo positivo foi analisada ao longo de 28 h à temperatura ambiente.

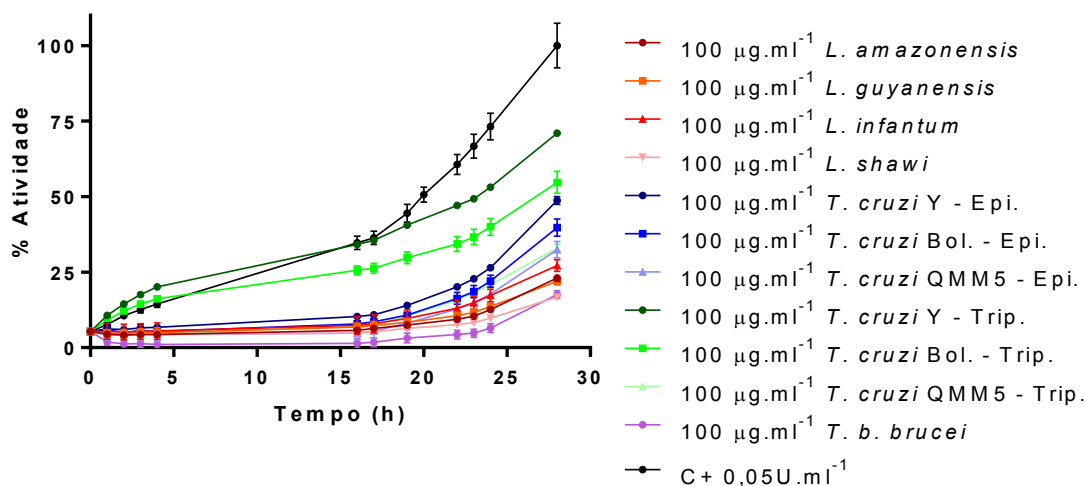


Figura 31: Atividade total dos extratos e do controlo positivo em colagénio.

Contrariamente ao expectável, uma vez que o controlo positivo é uma collagenase, observou-se em colagénio uma menor atividade proteolítica do controlo positivo (Fig. 31) comparativamente aos ensaios realizados em gelatina. Não obstante esta situação a diferença de valores de atividade entre as 0 h e as 28 h permaneceu estatisticamente significativa ($p = 0,0083$). Uma explicação viável para o ocorrido poderá ter sido a natural degradação da enzima consequência da sua frequente utilização que implicou numerosos ciclos de congelação e descongelação. Não obstante a menor a atividade da collagenase, a sua atividade permaneceu superior relativamente à dos extratos testados.

Embora tenha sido necessário aumentar a concentração da 1,10-fenantrolina para a inibição total da atividade enzimática do controlo positivo (Fig. 32), decorrente da sua elevada especificidade para com o substrato, este fenómeno não é extensível aos extratos parasitários. Por esse motivo, e por forma a se manterem condições de ensaio idênticas às aplicadas no estudo da atividade gelatinolítica utilizou-se, para efeitos de estudo da inibição de metaloproteases com atividade de collagenase, a concentração de 0,1 mM de 1,10-fenantrolina.

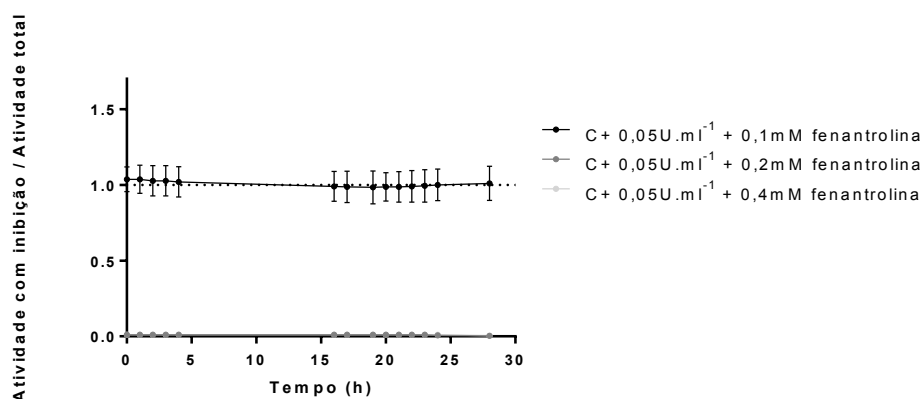


Figura 32: Efeito inibitório da atividade de collagenase, mediada por metaloproteases, do controle positivo, por 0,1, 0,2 e 0,4 mM de 1,10-fenentrolina, ao longo de 28 h, à T.A.

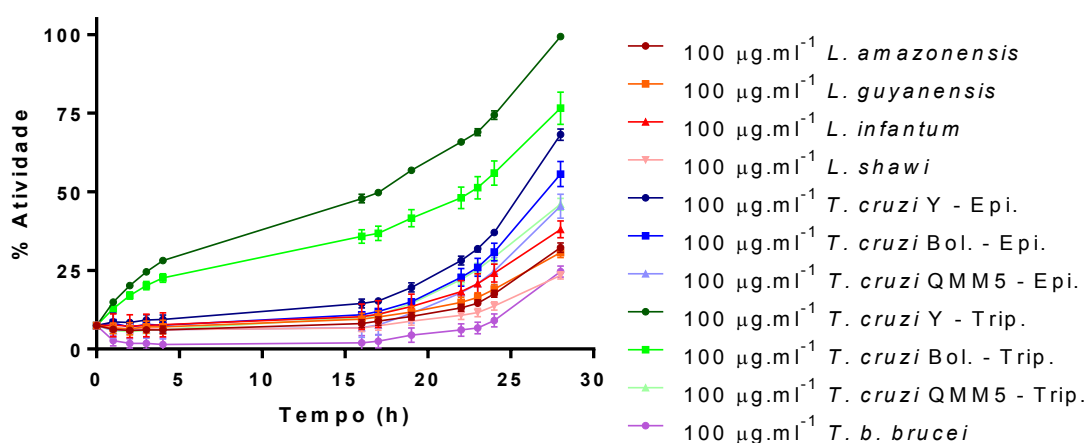


Figura 33: Atividade dos extratos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* em colagénio.

À semelhança do ocorrido nos ensaios de atividade de gelatinase, os extratos das formas epimastigotas de *T. cruzi* foram, de entre todos os extratos parasitários, os que apresentaram maior atividade enzimática em colagénio. A atividade dos extratos das formas tripomastigotas das estirpes Y e Bol. foi significativamente diferente da atividade de todos os restantes extratos; o mesmo não se verificou quando a atividade de ambos foi comparada entre si. Também a atividade de collagenase de *T. b. brucei* revelou-se, sem exceções, e com base em análises estatísticas, significativamente diferente de todas as restantes (Fig. 33). Estes resultados revelam que, independentemente do substrato utilizado, há claras e consistentes diferenças de atividade enzimática consoante o género dos parasitas ou espécie, se relativamente a *Trypanosoma*.

A obtenção de um perfil de atividade (Fig. 33) com cinética distinta, comparativamente ao determinado nos ensaios de avaliação da atividade gelatinolítica,

poderá ter sido decorrente da baixa temperatura ambiente que se verificou na época em que se realizaram estes ensaios. Embora esta tenha sido uma situação imprevista permitiu comprovar que a atividade enzimática das gelatinases e colagenases é influenciada pela temperatura.

A análise dos diferentes perfis de inibição de cada um dos extratos de *Leishmania* (Fig. 34) revelou que a 1,10 fenantrolina não surtiu efeito inibitório na atividade de colagenase do extrato de *L. amazonensis* (Fig. 33A) pelo que se depreende que, nesta espécie, a capacidade de hidrólise de colagénio não é devida à ação de metaloproteases. Contrariamente, nos extratos de *L. guyanensis* ($p = 0,0048$), *L. infantum* ($p < 0,0001$) e *L. shawi* ($p < 0,0001$), as diferenças de atividade ocorridas, e evidenciadas na Fig. 34, foram significativas pelo que parte da atividade proteolítica em colagénio é seguramente exercida por metaloproteases.

A redução, em 71%, da atividade de colagenase de *L. infantum* pela 1,10-fenantrolina revela que, nesta espécie de *Leishmania*, as metaloproteases são o principal fator de virulência a desempenhar função de colagenase. As metaloproteases com afinidade para colagénio podem, deste modo, ser uma fator determinante para a elevada morbidade e mortalidade associada à leishmaniose visceral zoonótica.

Apesar da elevada discrepância de reportório génico que se verifica entre os diferentes subgéneros de *Leishmania*, não se verificaram diferenças de atividade de metaloproteases em substrato de colagénio em função desta variável.

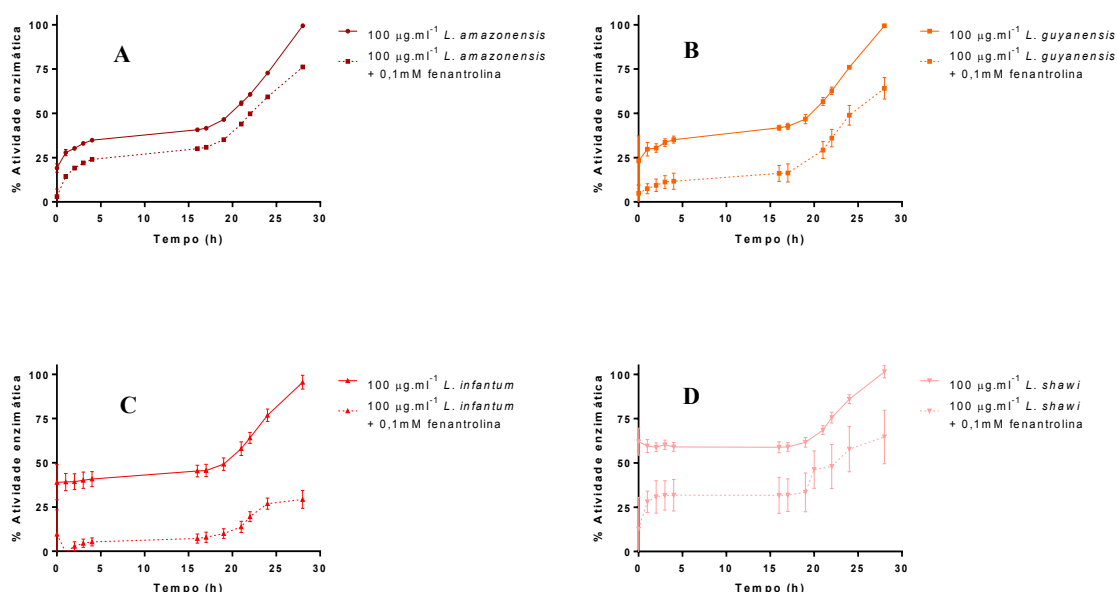


Figura 34: Atividade de colagenase dos extratos de *Leishmania* na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A. A – *L. amazonensis*; B – *L. guyanensis*; C – *L. infantum* e D – *L. shawi*.

A inibição da atividade de collagenase nos extratos de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Fig. 35), foi unicamente significativa na estirpe Y ($p = 0,0002$) (Fig. 35A). Mediante a comparação da sua atividade normal com a sua atividade inibida pela fenantrolina, concluiu-se que nesta estirpe, as metaloproteases são determinantes para a sua propriedade de collagenase dado serem responsáveis por 85% desta sua capacidade.

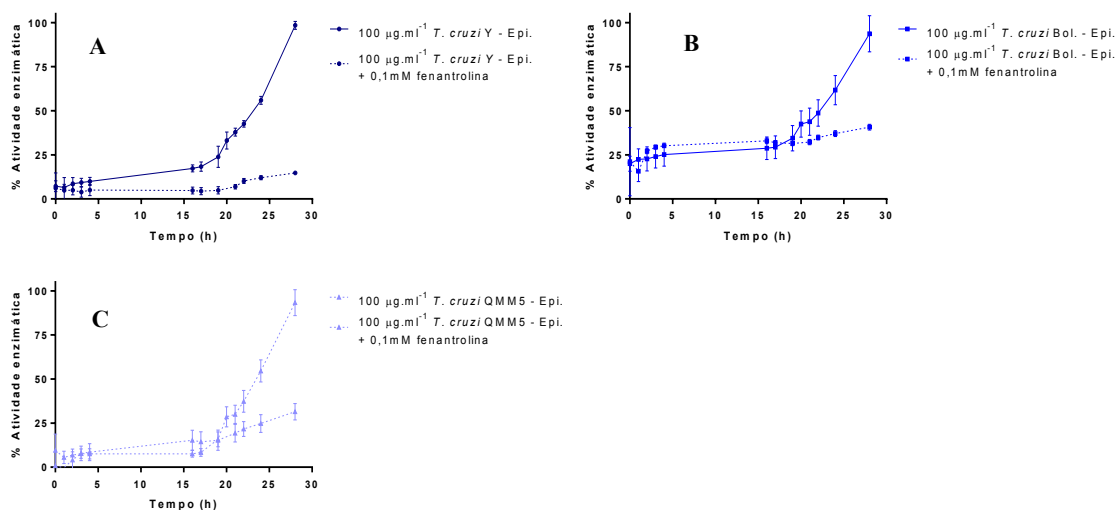


Figura 35: Atividade de collagenase dos extratos de epimastigotas de *T. cruzi* na presença e na ausência de 1,10-fenantroline, ao longo de 28 h à T.A. A – *T. cruzi* Y; B – *T. cruzi* Bol. e C – *T. cruzi* QMM5.

Nos extratos de formas tripomastigotas verificaram-se diferenças estatisticamente significativas exclusivamente na estirpe Bol.

Os resultados obtidos não estão totalmente concordantes com o esperado uma vez que, sendo as formas tripomastigotas as infetantes para o hospedeiro vertebrado, pelo que são naturalmente mais virulentas, era de esperar que os extratos de formas tripomastigotas revelassem maior capacidade proteolítica e que esta fosse superior à das formas epimastigotas. Embora nos ensaios baseados na atividade de gelatinase tenha sido possível associar a expressão enzimática à estirpe do parasita, nestes ensaios não foi possível fazer essa observação.

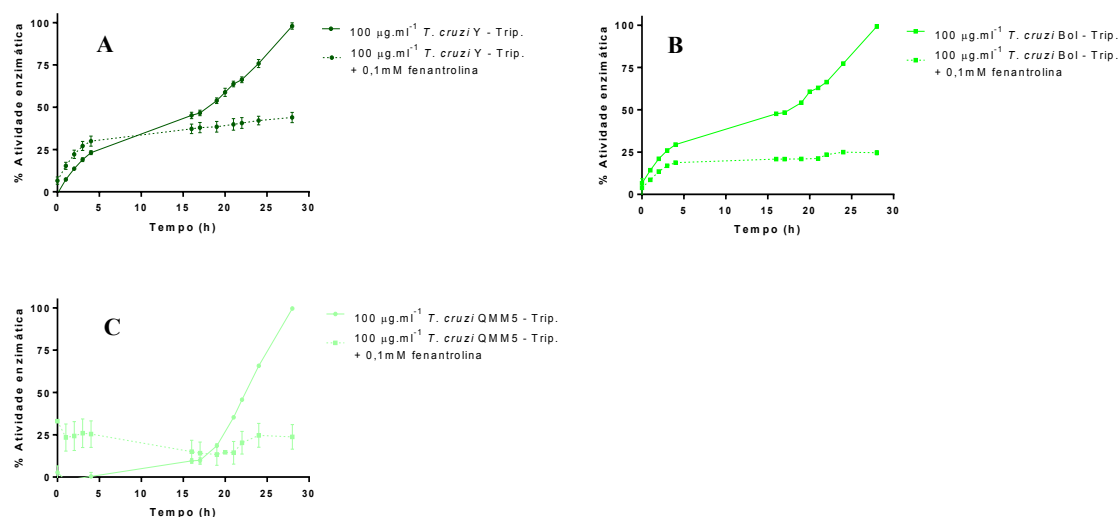


Figura 36: Atividade de collagenase dos extratos de tripomastigotas de *T. cruzi* na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina, ao longo de 28 h à T.A. A – *T. cruzi* Y; B – *T. cruzi* Bol. e C – *T. cruzi* QMM5.

Relativamente à atividade de collagenase dos extratos de *T. b. brucei*, não se observaram diferenças estatisticamente significativas mediante a adição de 1,10-fenantrolina (Fig. 37). Tendo o mesmo resultado sido observado nos ensaios de avaliação de atividade de gelatinase, coloca-se a hipótese de as condições de cultura axénica a que estiveram sujeitas tenha, de algum modo, conduzido à sua avirulência. É possível que as formas sanguíneas presentes no início da cultura tenham evoluído para formas associadas ao vetor, uma vez que foram mantidas à temperatura de +24°C, e desse modo terem sido destituídas de algumas das suas propriedades virulentas, entre elas, as metaloproteases.

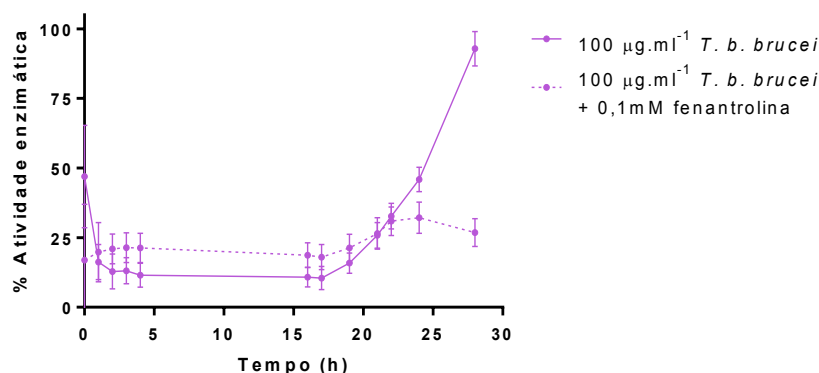


Figura 37: Atividade de collagenase de *Trypanosoma brucei brucei* na presença e na ausência de 1,10-fenantrolina ao longo de 28 h à T.A.

4.5. Avaliação da interação das metaloproteinases dos diferentes tripanosomatídeos com eritrócitos humanos e com possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento

4.5.1. Sensibilização de Eh por contato direto com extratos de *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*

A integridade estrutural dos eritrócitos de mamíferos é suportada por uma complexa rede de diferentes proteínas que constituem o citoesqueleto. Alterações bioquímicas ou estruturais que causem alteração desta estrutura ocasionam a sua sensibilização podendo culminar na lise da célula (Samanta *et al.*, 2012).

A sensibilização de eritrócitos pelos parasitas pode ocorrer através do reconhecimento e interação direta com antígenos expressos à superfície desta célula ou pode ser mediada pelo sistema complemento. De entre as diferentes proteínas que possui à superfície, encontra-se o CR1; parasitas opsonizados pelo fator C3b do complemento poderão assim ligar-se ao eritrócito (Mosser *et al.*, 1997, Domínguez & Toraño, 1999, Tambourgi *et al.*, 2002).

Nos ensaios de sensibilização de Eh pretendeu-se avaliar o efeito da interação direta de metaloproteinases de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei brucei*. Para a quantificação da sensibilização ocorrida, avaliou-se o nível de hemólise eritrócitária pois este é diretamente proporcional à lise destas células.

A comparação do nível de hemólise dos sobrenadantes de Eh incubados na presença de 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ não revelou diferenças suscetíveis de serem atribuídas à sensibilização direta dos eritrócitos pelos extratos dos parasitas.

Mediante a análise dos resultados apresentados nas figuras 38, 39 e 41 confirmou-se, através da comparação da % de lise dos eritrócitos dos controlos positivos, que ocorreu uma maior redução das populações eritrócitárias previamente incubadas/sensibilizadas com 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato. As diferenças constatadas ter-se-ão devido, presumivelmente, às diferenças de isotonicidade ocorridas durante o processo de sensibilização decorrentes das diferentes concentrações de extratos testadas.

4.5.2. Ensaios de estudo do complemento

Os eritrócitos sensibilizados com os diferentes extratos foram posteriormente incubados com soro autólogo contendo o sistema complemento ativo e inativado por forma a se aferir se este efetivamente desencadeia a sua lise.

Relativamente a *Leishmania*, confirma-se a ação do sistema complemento na lise de Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato (Fig. 38). Para todas os extratos das diferentes espécies de *Leishmania* verificou-se que na presença do sistema complemento inativado a lise eritrocitária foi menor comparativamente aos eritrócitos incubados com soro contendo o sistema complemento ativo.

Verificou-se maior % hemolítica eritrocitária decorrente da atuação do sistema complemento nos eritrócitos previamente sensibilizados com os extratos de *L. amazonensis* e *L. guyanensis*.

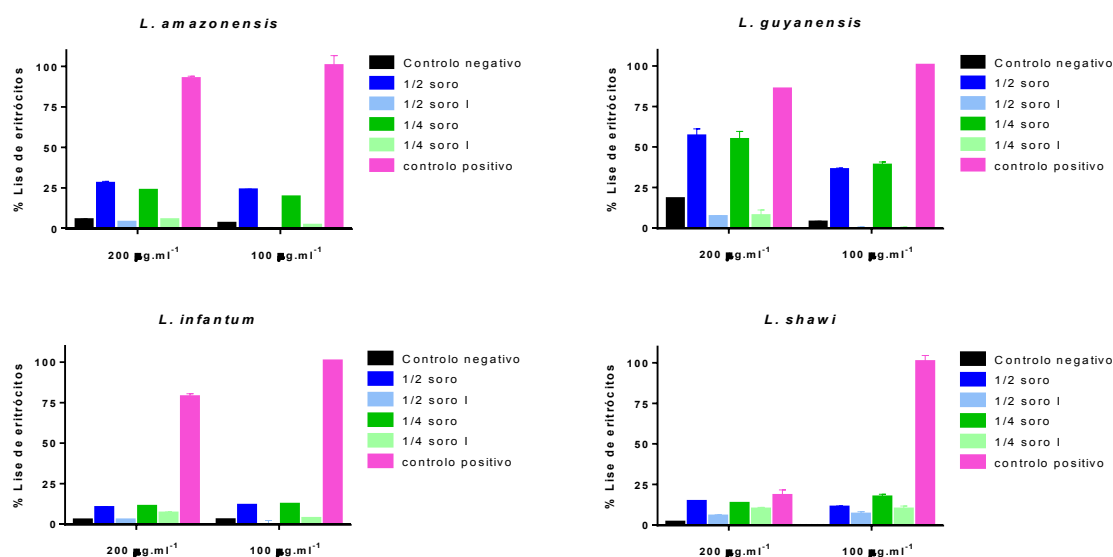


Figura 38: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de *Leishmania*.

Relativamente às formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* (Fig. 39 e 40) observa-se que não houve diferenças nas % de lise dos Eh incubados com o sistema complemento ativo e inativado.

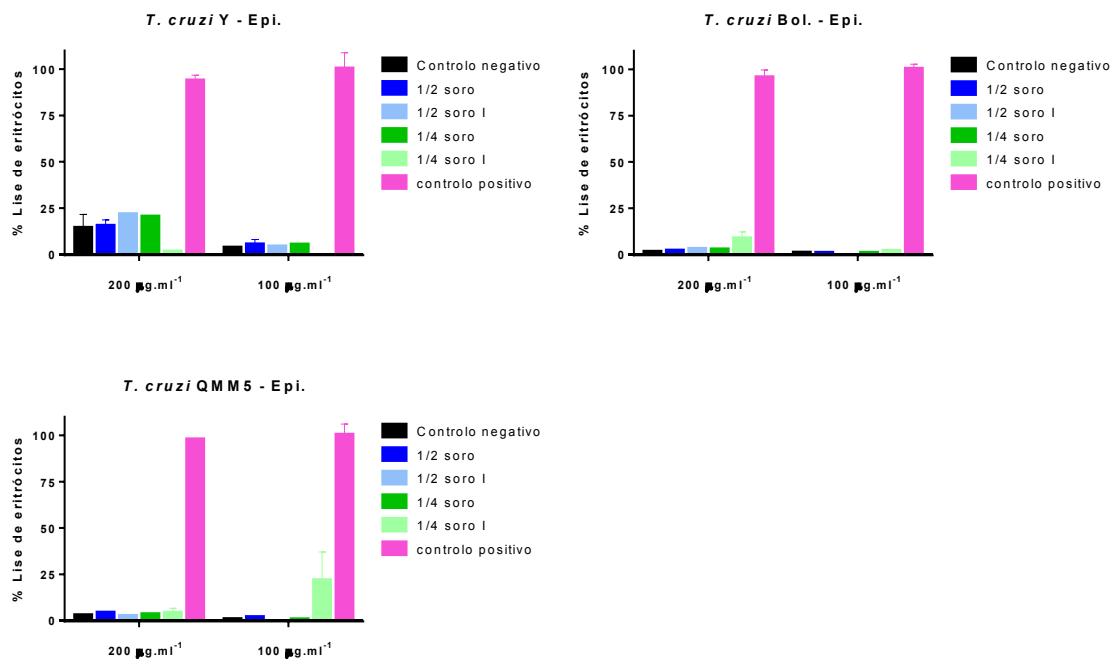


Figura 39: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 µg.ml⁻¹ de extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

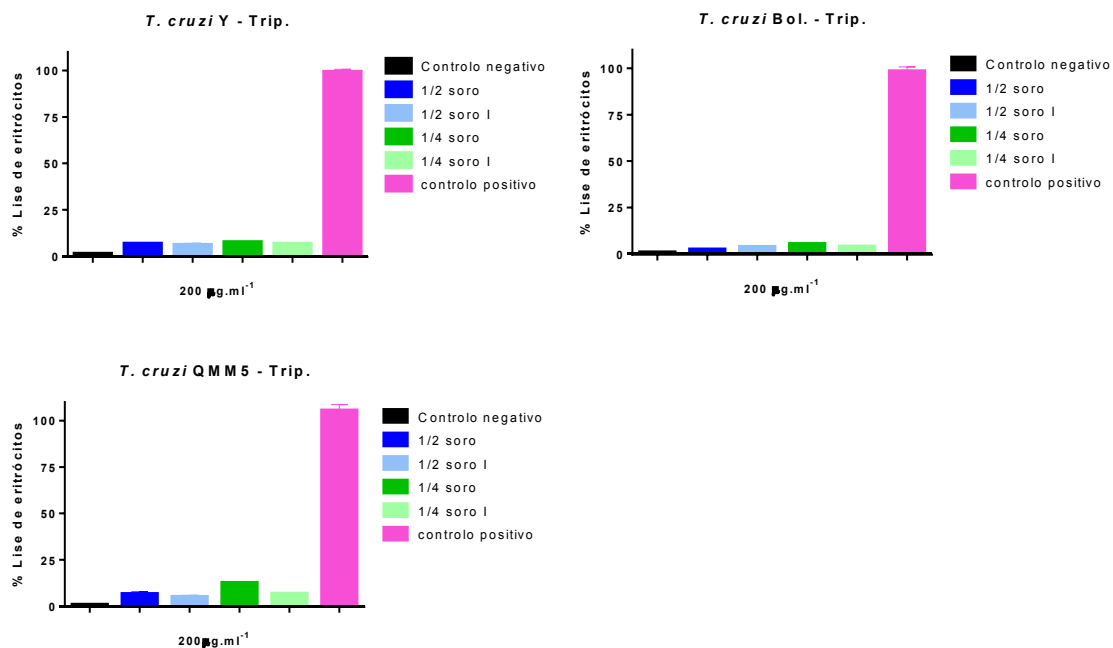


Figura 40: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 µg.ml⁻¹ de extrato de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Em ensaios de complemento com eritrócitos previamente sensibilizados com extrato de *T. b. brucei*, embora se verifique, a ocorrência de uma ligeira % lítica dos eritrócitos (Fig. 41), esta não se deveu ao sistema complemento pois a sua inativação não ocasionou o decréscimo da hemólise.

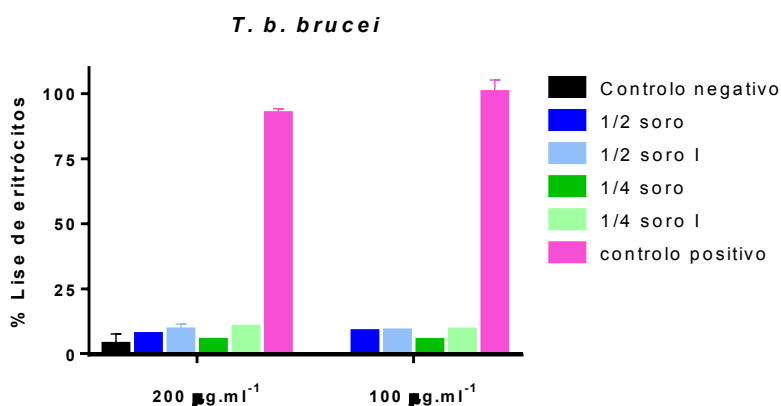


Figura 41: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 e 200 µg.ml⁻¹ de extrato de *T. brucei brucei*

4.5.3. Ensaios de estudo do complemento na presença de EDTA

Dado os Eh previamente tratados com extratos de *Leishmania* terem sido os únicos a sofrerem hemólise mediada pelo sistema complemento, pretendeu-se averiguar se as metaloproteases seriam responsáveis por este fenómeno biológico.

Em Eh previamente incubados com extratos *Leishmania* na presença de 10 mM de EDTA, um quelante de iões de Ca²⁺ e Mg²⁺, e na ausência de um ambiente livre destes iões, não se observaram diferenças na % de lise nos ensaios de complemento, comparativamente aos ensaios em que não se procedeu à inibição de metaloproteases no processo de sensibilização eritrocitária (Fig. 42).

Os resultados obtidos poderão indicar que a concentração de inibidor adicionada no processo de inibição foi insuficiente para inibir toda a atividade metaloproteolítica.

Tendo sido os extratos de *Leishmania* diluídos diretamente no sistema de sensibilização eritrocitária, e encontrando-se o extrato de *L. infantum* utilizado altamente concentrado relativamente aos restantes, é possível que a concentração verdadeiramente testada fosse superior à teórica o que poderá ter motivado o inflacionamento dos resultados, relativos a esta espécie (Fig. 42 e 43).

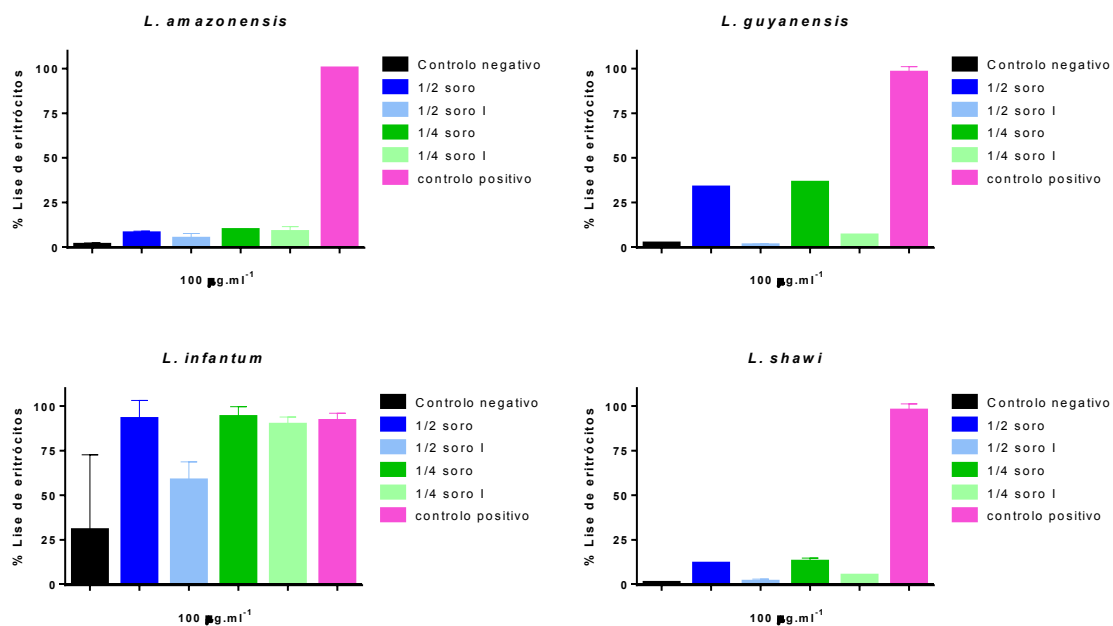


Figura 42: Efeito do complemento em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 µg.ml⁻¹ de extrato de *Leishmania* na presença de 10 mM de EDTA e na ausência de iões de Ca²⁺ e Mg²⁺.

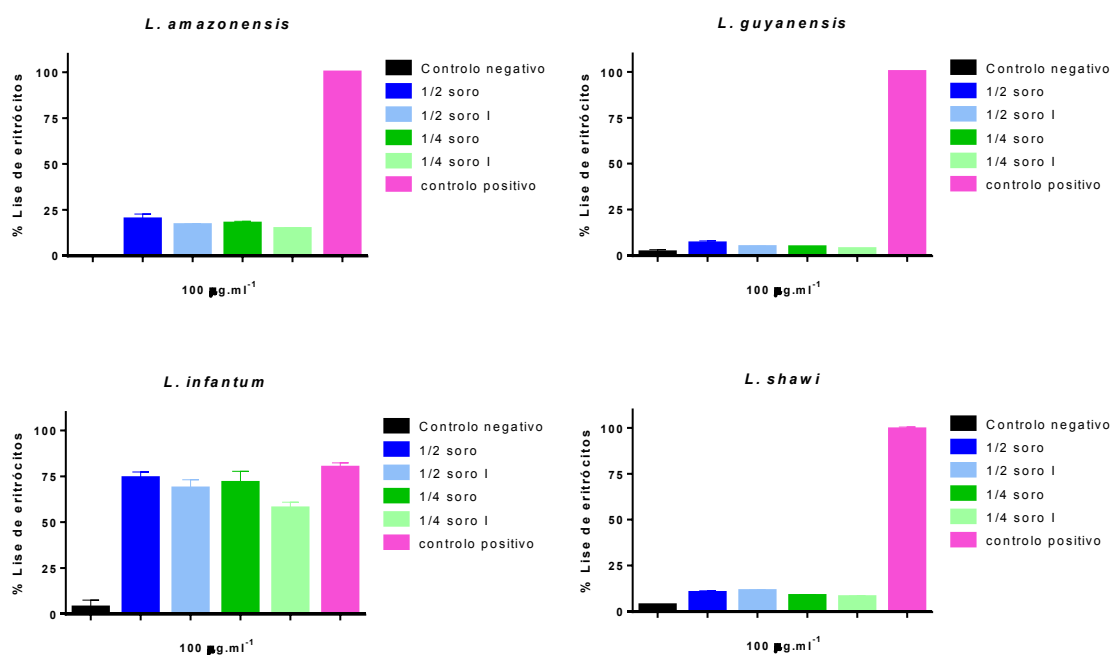


Figura 43: Efeito do complemento por 10 mM em 2% Eh previamente sensibilizados com 100 µg.ml⁻¹ de extrato de *Leishmania* na presença de 10 mM de EDTA e na ausência de iões de Ca²⁺ e Mg²⁺.

Nos ensaios em que se procedeu ao tratamento dos Eh com $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de extrato de *Leishmania* na presença de 10 mM de EDTA e na ausência de iões de Ca^{2+} e Mg^{+2} seguidos de incubação com soro autólogo, contendo o sistema complemento ativo e inativado e na presença de 10 mM de EDTA, verificou-se que a reduzida % de hemólise ocorrida não se deveu ao sistema complemento. Estes resultados revelam a importância das metaloproteases de *Leishmania* spp. na sensibilização de Eh e consequente lise mediada pelo sistema complemento.

5. Conclusão

No presente trabalho verificou-se que todos os extratos parasitários apresentam atividade enzimática em géis de colagénio, gelatina e caseína ainda que com perfis diferentes o que aponta para a especificidade da atividade enzimática, tendo sido confirmada a natureza metaloproteica das enzimas.

A otimização de ensaios de inibição em substrato de gelatina e colagénio contendo fluoresceína resultou no desenvolvimento de uma técnica que poderá ser aplicada a outros campos de interesse. No presente trabalho permitiu verificar que o perfil de expressão de metaloproteases de *L. shawi* é distinto comparativamente às restantes espécies de *Leishmania*. Em *T. cruzi* concluiu-se que a atividade metaloproteolítica dos extratos varia em função das estirpes e, por conseguinte, dos DTU que cada uma integra. A menor velocidade de reação enzimática das metaloproteases de *T. b. brucei* sugere uma menor concentração ou atividade da enzima no extrato.

Os resultados obtidos nos ensaios de sensibilização de eritrócitos por extratos de *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. b. brucei* permitiram a constituição de um modelo biológico de infeção, tendo ficado estabelecido que as metaloproteases de *Leishmania* spp. sensibilizam os Eh que, por sua vez, são lisados pelo sistema complemento.

Dada a importância das funções biológicas destas enzimas, o conhecimento do perfil de expressão nos diferentes tripanossomatídeos e dos mecanismos biológicos de infeção pode constituir uma oportunidade para a identificação de novos alvos terapêuticos e, consequentemente, para o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas e terapêuticas.

6. Referências bibliográficas

- Abu-Dayyeh I., Shio M.T., Sato S., Akira S., Cousineau B., Olivier M., 2008. *Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2:e305.
- Afonso & Alves-Pires, 2008. Bioecologia dos vectores. In *Leishmaniose canina*. Ed. Chaves Ferreira Publicações. 1ª. Edição. Lisboa. Portugal. 27-40.
- Allenbach C., Zufferey C., Perez C., Launois P., Mueller C., Tacchini-Cottier F., 2006. Macrophages induce neutrophil apoptosis through membrane TNF, a process amplified by *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 176:6656-64.
- Alvarez V.E., Niemirowicz G.T., Cazzulo J.J., 2012. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochimica et Biophysica*, 1824:195-206.
- Araújo P.R., Teixeira S.M., 2011. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106:257-66.
- Awasthi A., Mathur R.K., Saha B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J. Med. Res.*, 119:238-58.
- Bangs J.D., Ransom D.M., McDowell M.A., Brouch E.M., 1997. Expression of bloodstream variant surface glycoproteins in procyclic stage. *Trypanosoma brucei*: role of GPI anchors in secretion. *The EMBO Journal*, 16:4285-94.
- Baker J.R., 1963. Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein, 1901. *Experimental Parasitology*, 13:219-33.
- Baral T.N., 2010. Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010:389153.

Besteiro S., Williams R.A.M., Coombs G.H., Mottram J.C., 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, 37:1063-1075.

Beurden P.A.N.S., Hoff J.W.V; 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, 38:73–83.

Bhardwaj S., Srivastava N., Sudan R., Saha B., 2010. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010:109189.

Bianchini G., Bocedi A., Ascenzi P., Gavuzzo E., Mazza F., Aschi M., 2006. Molecular dynamics simulation of *Leishmania major* surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). *Proteins*, 64:385-90.

Bogdan C., Donhauser N., Döring R., Röllinghoff M., Diefenbach A., Rittig M.G., 2000. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. *J. Exp. Med.*, 191:2121-30.

Bossard G., Cuny G., Geiger A., 2013. Secreted proteases of *Trypanosoma brucei gambiense*: possible targets for sleeping sickness control?. *Biofactors*, 39:407-14.

Bradford S., McGwire B.S., Chang K.P., 1996. Posttranslational regulation of a *Leishmania* HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of site-specific mutagenesis of catalytic, zinc binding, N-glycosylation, and glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage, intracellular stability, and extracellular exit. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:7903-9.

Brittingham A., Chen G, McGwire B.S., Chang K.P., Mosser D.M., 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infection and Immunity*, 67:4477-84.

Carvalho A.K., Silveira F.T. Passero L.F., Gomes C.M., Corbett C.E., Laurenti M.D., 2012. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model, *Parasite Immunology* 34:395-403.

Cecílio P., Pérez-Cabezas B., Santarém N., Maciel J., Rodrigues V., Cordeiro da Silva A., 2014. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Frontiers in Immunology*, 5:480.

Chagas, C., 1909. Nova tripanozomase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1:159–218.

Chandler J.A., James P.M., 2013. Discovery of trypanosomatid parasites in globally distributed drosophila species. *PLoS ONE*, 8:e61937.

Charmoy M., Auderset F., Allenbach C., Tacchini-Cottier F., 2009. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010:71936.

Chevallet M., Luche S., Rabilloud T., 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1: 1852–1858.

Clayton C.E., 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal*, 21:1881-8.

Clayton C., Shapira M., 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 156:93–101.

Contreras I., Gómez M.A., Nguyen O., Shio M.T., McMaster R.W., Olivier M., 2010. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathogens*, 6:e100114810.

Contreras V.T., De Lima A.R., Navarro M.C., 2006. *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: relevant factors for in vitro differentiation. *Acta Biol. Venez.*, 26:49-60.

Croft S.L., Sundar S., Fairlamb H.A., 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 111–126.

Cuevas I.C., Cazzulo J.J., Sánchez D.O., 2003. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infection and Immunity*, 71:5739-49.

da Costa T.A., Silva M.V., Mendes M.T., Carvalho-Costa T.M., Batista L.R., Lages-Silva E., Rodrigues V., Oliveira C.J., Ramirez L.E., 2014. Immunomodulation by *Trypanosoma cruzi*: toward understanding the association of dendritic cells with infecting TcI and TcII populations. *Journal of Immunology Research*, 2014:962047.

d'Avila-Levy C.M., Altoé E.C., Uehara L.A., Branquinha M.H., Santos A.L., 2013. GP63 function in the interaction of trypanosomatids with the invertebrate host: facts and prospects. *Subcell Biochem*, 74:253-70.

Denny P.W., Smith D.F., 2004. Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. *Molecular Microbiology*, 53:725-33.

Despommier D.D., Gwadz R.W., Hotez P.J., Knirsch C.A., 2005. In: *Parasitic Diseases*, 5th edition. Apple Trees Productions Llc, ISBN 0-9700027-7-7.

Domínguez M, Toraño A., 1999. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 189:25-35.

Donelson J.E., Hill K.L., El-Sayed N.M., 1998. Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91:51–66.

Elias C.G., Pereira F.M., Silva B.A., Alviano C.S., Soares R.M., Santos A.L., 2006. Leishmanolysin (gp63 metallopeptidase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*. *Parasitology*, 132:37-47.

El-Sayed N.M., Donelson J.E., 1997. African trypanosomes have differentially expressed genes encoding homologues of the *Leishmania* GP63 surface protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 272:26742-8.

El-Sayed N.M., Myler P.J., Bartholomeu D.C., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A.N., Ghedin E., Worthey E.A., Delcher A.L., Blandin G., Westenberger S.J., Caler E., Cerqueira G.C., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D.A., Carrington M., Crabtree J., Darban H., da Silveira J.F., de Jong P., Edwards K., Englund P.T., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A.C., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M.J., Lorenzi H., Louie T., Machado C.R., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J.C., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J.L., Rinta J., Robertson L., Salzberg S.L., Sanchez D.O., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A.J., Sisk E., Tammi M.T., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P.N., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C.M., Stuart K.D., Andersson B., 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 15;309:409-15.

Gamboa D, Torres K, De Doncker S, Zimic M, Arevalo J, Dujardin JC., 2008. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*, 135:319-26.

Giorgio S., Santos M.R., Straus A.H., Takahashi H.K., Barbiéri C.L., 2003. Effect of glycosphingolipids purified from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes on human peripheral lymphocytes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 10:469-72.

González-Aseguinolaza G., Almazán F., Rodríguez J.F., Marquet A., Larraga V., 1997. Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1361:92-102.

Grandgenett P.M., Coughlin B.C., Kirchhoff L.V., Donelson J.E., 2000. Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 110:409-15.

Grandgenett P.M., Otsu K., Wilson H.R., Wilson M.E., Donelson J.E., 2007. A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes. *PLoS Pathogens*, 3:1432-45.

Gruszyński A.E., DeMaster A., Hooper N.M., Bangs J.D., 2003. Surface coat remodeling during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 278:24665-72.

Gruszyński A.E., van Deursen F.J., Albareda M.C., Best A., Chaudhary K., Cliffe L.J., del Rio L., Dunn J.D., Ellis L., Evans K.J., Figueiredo J.M., Malmquist N.A., Omosun Y., Palenchar J.B., Prickett S., Punkosdy G.A., van Dooren G., Wang Q., Menon A.K., Matthews K.R., Bangs J.D., 2006. Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 147:211-23.

Hallé M., Gomez M.A., Stüble M., Shimizu H., McMaster W.R., Olivier M., Tremblay M.L., 2009. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 284:6893-908.

Havelková H., Badalová J., Svobodová M., Vojtková J., Kurey I., Vladimirov V., Demant P., Lipoldová M., 2006. Genetics of susceptibility to leishmaniasis in mice: four novel loci and functional heterogeneity of gene effects. *Genes and Immunity*, 7:220-33.

Hassani K., Shio M.T., Martel C., Faubert D., Olivier M., 2014. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. *PLoS One*, 9:e95007.

Hoare C.A., 1964. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. revision of the systematics. *The Journal of Protozoology*, 11:200-7.

Honiberg B.M., 1963. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *The Journal of Protozoology*, 10:20-63.

Hsiao C.H., Yao C., Storlie P., Donelson J.E., Wilson M.E., 2008. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 157:148-59.

International Glossina Genome Initiative, 2014. Genome sequence of the tsetse fly (*Glossina morsitans*): *Vector of African trypanosomiasis*. *Science*. 344:380.

Isnard A., Shio M.T., Olivier M., 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2:72.

Jaramillo M., Gomez M.A., Larsson O., Shio M.T., Topisirovic I., Contreras I., Luxenburg R., Rosenfeld A., Colina R., McMaster R.W., Olivier M., Costa-Mattioli M., Sonenberg N., 2011. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe*, 9:331-41.

Jennings Y.L., de Souza A.A., Ishikawa E.A., Shaw J., Lainson R., Silveira F., 2014. Phenotypic characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in the lower Amazon region, western Pará state, Brazil, reveals a putative hybrid parasite, *Leishmania (Viannia) guyanensis* × *Leishmania (Viannia) shawi shawi*, *Parasite Immunology* 21:1-11.

Jung C.M., Matsushita O., Katayama S., Minami J., Sakurai J., Okabe A., 1999. Identification of metal ligands in the *Clostridium histolyticum* ColH collagenase. *Journal of Bacteriology*, 181:2816-22.

Karin M., Liu Zg., Zandi E., 1997. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 9:240-6.

Kaye P., Scott P., 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews, Microbiology*, 9:604-15.

Kissinger J.C., 2006. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *TRENDS in Parasitology*, 22:240-3

Kollien A.H., Schaub G.A., 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*, 16:381-387.

Kramer S., 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 181:61-72.

Kulkarni M.M., Olson C.L., Engman D.M., McGwire B.S., 2009. *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. *Infection and Immunity*, 77:2193-200.

LaCount D.J., Gruszynski A.E., Grandgenett P.M., Bangs J.D., Donelson J.E., 2003. Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (GP63) genes. *Journal of Biological Chemistry*, 278:24658-64.

Lambertz U., Silverman J.M., Nandan D., McMaster W.R., Clos J., Foster L.J., Reiner N.E., 2012. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 91:887-99.

Lee S.H., Stephens J.L., Englund P.T., 2007. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nature Reviews Microbiology*, 5:287-97.

Lewis M.D., Ma J., Yeo M., Carrasco H.J., Llewellyn M.S., Miles M.A., 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81:1041-9.

Lieke T., Nylén S., Eidsmo L., McMaster W.R., Mohammadi A.M., Khamesipour A., Berg L., Akuffo H., 2008. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clinical and Experimental Immunology*, 153:221-30.

Liu D., Uzonna J.E., 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2:83.

Lopes A.H., Souto-Padón T., Dias F.A., Gomes M.T., Rodrigues G.C., Zimmermann L.T., Alves T.L., Vermelho A.B., 2010. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. *The Open Parasitology Journal*, 4:30–59.

Lukeš J., Skalický T., Týč J., Votýpka J., Yurchenko V., 2014. The evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology*, 195:115-22.

MacGregor P., Szöör B., Savill N.J., Matthews K.R., 2012. Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. *Nature Reviews Microbiology*, 10:431-8.

Manna P.T., Boehm C., Leung K.F., Natesan S.K., Field M.C., 2014. Life and times: synthesis, trafficking, and evolution of VSG. *Trends in Parasitology*, 30:251-8.

Maroli M., Feliciangeli M.D., Bichaud L., Charrel R.N., Gradoni L., 2013. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27:123–147.

Maslov D.A., Votýpka J., Yurchenko V., Lukeš J., 2013. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*, 29:43-52.

Matayoshi-Calixto P.H., Fagundes D.S., Sá de Oliveira J.C., 2014. Estrutura tridimensional da Major Surface Protease de *Leishmania guyanensis* resolvida por modelagem comparativa. *Biota Amazônia*, 4:74-80.

McConville M.J., Mullin K.A., Ilgoutz S.C., Teasdale R.D., 2002. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66:122-54.

McGwire B.S., Chang K.P., Engman D.M., 2003. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infection and Immunity*, 71:1008-10.

McGwire B.S., O'Connell W.A., Chang K.P., Engman D.M., 2002. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:8802-9.

Mogk S., Meiwes A., Shtopel S., Schraermeyer U., Lazarus M., Kubata B., Wolburg H., Duszenko M., 2014. Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. *PLoS One*, 9:e91372.

Mosser D.M., Brittingham A., 1997. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, 115:9-23.

Neuber H., 2008. Leishmaniasis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 6:754–765.

Olivier M., Atayde V.D., Isnard A., Hassani K., Shio M.T., 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and Infection*, 14:1377-89.

Olivier M., Gregory D.J., Forget G., 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*, 18:293-305.

Pandey S., Chakraborti P., Sharma R., Bandyopadhyay S., Sarkar D., Adhya S., 2004. Involvement of *Leishmania donovani* major surface glycoprotein gp63 in promastigote multiplication. *J. Biosci.* 29:15-22.

Papadopoulou B., Huang X-F., Boucher N., McNicoll F., 2003. Stage-Specific Regulation of Gene Expression in *Leishmania*. *ASM News*, 69:282-288.

Passero L.F., Carvalho A.K., Bordon M.L., Bonfim-Melo A., Carvalho K., Kallás E.G., Santos B.B., Toyama M.H., Paes-Leme A., Corbett C.E., Laurenti M.D., 2012. Proteins of *Leishmania (Viannia) shawi* confer protection associated with Th1 immune response and memory generation. *Parasites & Vectors*, 5:64.

Peacock C.S., Seeger K., Harris D., Murphy L., Ruiz J.C., Quail M.A., Peters N., Adlem E., Tivey A., Aslett M., Kerhornou A., Ivens A., Fraser A., Rajandream M.A., Carver T., Norbertczak H., Chillingworth T., Hance Z., Jagels K., Moule S., Ormond D., Rutter S., Squares R., Whitehead S., Rabbinowitsch E., Arrowsmith C., White B., Thurston S., Bringaud F., Baldauf S.L., Faulconbridge A., Jeffares D., Depledge D.P., Oyola S.O., Hilley J.D., Brito L.O., Tosi L.R., Barrell B., Cruz A.K., Mottram J.C., Smith D.F., Berriman M., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics*, 39:839-47.

Ralton J.E., Mullin K.A., McConville M.J., 2002. Intracellular trafficking of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins and free GPIs in *Leishmania mexicana*. *Biochem. J.*, 363:365-375

Rassi-Jr A.R., Rassi A., Rezende J.M., 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26:275–29.

Razzazan A., Saberi M.R., Jaafari M.R., 2008. Insights from the analysis of a predicted model of gp63 in *Leishmania donovani*. *Bioinformation*, 3:114-8.

Real F., Vidal R.O., Carazzolle M.F., Mondego J.M., Costa G.G., Herai R.H., Würtele M., de Carvalho L.M., Carmona e Ferreira R., Mortara R.A., Barbiéri C.L., Mieczkowski P., da Silveira J.F., Briones M.R., Pereira G.A., Bahia D., 2013. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Research*, 20:567-81.

Ribeiro A.R., Mendonça V.J., Alves R.T., Martinez I., Araújo R.F., Mello F., da Rosa J.A., 2014. *Trypanosoma cruzi* strains from triatomine collected in Bahia and Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Saúde Pública*, 48:295-302.

Sacks D., Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Reviews Immunology*, 2:845-58.

Sádlová J., Volf P., Victoir K., Dujardin J.C., Votýpka J., 2006. Virulent and attenuated lines of *Leishmania major*: DNA karyotypes and differences in metalloproteinase GP63. *Folia Parasitologica*, 53:81-90.

Samanta S., Ghoshal A., Bhattacharya K., Saha B., Walden P., Mandal C., 2012. Sialoglycosylation of RBC in visceral leishmaniasis leads to enhanced oxidative stress, calpain-induced fragmentation of spectrin and hemolysis. *PLoS One*, 7:e42361.

Santos A.L., Abreu C.M., Alviano C.S., Soares R.M., 2005. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology*, 130:79-88.

Santos A.L.S, Branquinha M.H., d'Avila-Levy C.M., 2006. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids in the search for a function. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78:687-714.

Schlagenhauf E., Etges R., Metcalf P., 1998. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*, 6:1035-46.

Schwede A., Kramer S., Carrington M., 2012. How do trypanosomes change gene expression in response to the environment?. *Protoplasma*, 249:223-38.

Shapira M., Zinoviev A., 2011. *Leishmania* parasites act as a Trojan horse that paralyzes the translation system of host macrophages. *Cell Host Microbe*. 9:257-9.

Shio M.T., Hassani K., Isnard A., Ralph B., Contreras I., Gomez M.A., Abu-Dayyeh I., Olivier M., 2012. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *Journal of Tropical Medicine*, 2012:819512.

Siegel T.N., Gunasekera K., Cross G.A.M., Ochsenreiter T., 2011. Gene expression in *Trypanosoma brucei*: lessons from high-throughput RNA sequencing. *Trends in Parasitology*, 27:434-441.

Silva-Almeida M, Pereira B.A., Ribeiro-Guimarães M.L., Alves C.R., 2012. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors*, 5:160.

Silva-Almeida M., Souza-Silva F., Pereira B.A., Ribeiro-Guimarães M.L., Alves C.R., 2014. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. *Parasites & Vectors*, 7:387

Silverman J.M., Reiner N.E., 2012. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1:26.

Sousa K.P., Atouguia J., Silva M.S., 2010. Partial biochemical characterization of a metalloproteinase from the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei* parasites. *Protein Journal*, 29:283-9.

Stevens J., Gibson W., 1999. The evolution of salivarian *Trypanosomes*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 94.

Tambourgi D.V., De Sousa Da Silva M., Billington S.J., Gonçalves De Andrade R.M., Magnoli F.C., Songer J.G., Van Den Berg C.W., 2002. Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases. *Immunology*, 107:93-101.

Teixeira A.R.L., Nitz N., Guimaro M.C., Gomes C., Santos-Buch C.A., 2006. Chagas disease. *Postgrad. Med. J.*, 82:788–798.

Teixeira S.M.R., 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31:1503-1516.

Teixeira S.M., de Paiva R.M.C., Kangussu-Marcolino M.M., Darocha WD, 2012. Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genetics and Molecular Biology*, 35:1–17.

Tripathi P., Singh V., Naik S., 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51:229-42.

Trumper, E.V., Gorla, D.E., 1991. Density-dependent timing of defaecation by *Triatoma infestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 800-802.

Tyler K.M., Engman D.M., 2000. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 46:269-78.

Ueno N., Wilson M.E., 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends in Parasitology*, 28:335-44.

Victoir K., Arevalo J., De Doncker S., Barker D.C., Laurent T., Godfroid E., Bollen A., Le Ray D., Dujardin J.C., 2005. Complexity of the major surface protease (msp) gene organization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*: evolutionary and functional implications. *Parasitology*, 131:207-14.

Vickerman K., 1985. Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *British Medical Bulletin*, 41:105-114

Votypka J., Suková E., Kraeva N., Ishemgulova A., Duř I., Yurchenko V., Luke J., 2013. Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) parasitizing fleas (Insecta: Siphonaptera) and description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist*, 164:763-781.

Waller R.F., McConville M.J., 2002. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology*, 32:1435-45.

Wenzel U.A., Bank E., Florian C., Förster S., Zimara N., Steinacker J., Klinger M., Reiling N., Ritter U., van Zandbergen G., 2012. *Leishmania major* parasite stage-dependent host cell invasion and immune evasion. *The FASEB Journal*, 26:29-39.

Westenberger S.J., Barnabé C., Campbell D.A., Sturm N.R., 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 171:527-43.

Wheeler R.J., Gluenz E., Gull K., 2013. The limits on Trypanosomatid morphological diversity. *PLoS ONE*, 8:e79581.

WHO, 2007. Report of the global partners meeting on neglected tropical diseases 2007 - a turning point. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

WHO, 2013. Second who report on neglected tropical, sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases, diseases.

Yao C., Donelson J.E., Wilson M.E., 2003 The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 132:1-16.

Yao C., Luo J., Storlie P., Donelson J.E., Wilson M.E., 2004. Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 135:171-83.

Yao C., Donelson J.E., Wilson M.E., 2007. Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania* spp. and their differential release from promastigotes. *Eukaryot Cell*, 6:1905-12.

Yao C., 2010. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all?. *Infection and Immunity*, 78:22-31.

Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., Guhl F., Lages-Silva E., Macedo A.M., Machado C.R., Miles M.A., Romanha A.J., Sturm N.R., Tibayrenc M., Schijman A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104:1051-4.

Zingales B., Miles M.A., Campbell D.A., Tibayrenc M., Macedo A.M., Teixeira M.M., Schijman A.G., Llewellyn M.S., Lages-Silva E., Machado C.R., Andrade S.G., Sturm N.R., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12:240-53.